VITAMINE D_3 3 C^{14}
EEN ONDERZOEK NAAR HET VERDWIJNEN VAN VITAMINE D_3 UIT EEN DOOR INTRAMUSCULAIRE INJECTIE GEVORMD DEPOT

(WITH A SUMMARY IN ENGLISH)

STANFORD MEDICAL LIBRARY

J. P. L. BOTS

Leiden 52

VITAMINE D_3 3 C^{14}

EEN ONDERZOEK NAAR HET VERDWIJNEN VAN VITAMINE D_3 UIT EEN DOOR INTRAMUSCULAIRE INJECTIE GEVORMD DEPOT

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/vitamined33c14ee0000jplb

VITAMINE D_3 3 C^{14}
EEN ONDERZOEK NAAR HET VERDWIJNEN VAN VITAMINE D_3 UIT EEN DOOR INTRAMUSCULAIRE INJECTIE GEVORMD DEPOT

(WITH A SUMMARY IN ENGLISH)

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Dr J. J. L. DUYVENDAK, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, TE VERDEDIGEN OP DONDERDAG 18 DECEMBER 1952 TE 15 UUR

DOOR

JOANNES PETRUS LAMBERTUS BOTS
GEBOREN TE LEIDEN
IN 1923

N.V. GRAFISCH BEDRIJF EN UITGEVERIJ DE JONG - LEIDEN

PROMOTOR
PROF. DR E. HAVINGA

AAN MIJN OUDERS

INHOUD

Inleiding 9

HOOFDSTUK I
De synthese van met C^{14} gemerkt vitamine D_3 13

HOOFDSTUK II
Meting van de radioactiviteit van de met C^{14} gemerkte praeparaten 82

HOOFDSTUK III
De extinctiometrische bepaling van vitamine D 92

HOOFDSTUK IV
Onderzoekingen over het door intramusculaire injectie gevormde depot van vitamine D_3 98

Summary 112

Literatuur 114

INLEIDING

De snelle vergroting van onze kennis op het gebied der vitaminen en hormonen is een van de meest indrukwekkende verschijnselen in de tegenwoordige ontwikkeling der natuurwetenschappen. Het besef, dat er vele stoffen in zeer kleine hoeveelheden nodig zijn om de goede gang van zaken in het levende organisme door hun catalytische werking te regelen, heeft zich in algemene zin pas sedert ongeveer een halve eeuw baan gebroken.

Op het ogenblik kennen we van een groot aantal ergonen de chemische samenstelling en de precieze ruimtelijke bouw der moleculen. Zelfs zijn de meeste van deze vaak ingewikkelde stoffen, gesynthetiseerd; de industriële productie maakt medische toepassing in uitgebreide mate mogelijk. Het meest verheugende van wetenschappelijk standpunt gezien, is echter wel, dat men er zich bij een aantal van deze ergonen niet meer toe hoeft te beperken descriptief de invloed op de physiologie van het levende organisme of op de opheffing van deficientieverschijnselen weer te geven. Het is in enkele gevallen mogelijk gebleken op grond van zeer verfijnde experimentele onderzoekingen precies de rol, die een bepaald vitamine in de levensprocessen speelt, aan te duiden. Dit is bijvoorbeeld het geval bij een aantal vitaminen van de B-groep, welke in het lichaam als bouwsteen van cofermenten fungeren: vitamine B_1 van het cocarboxylase, B_2 van de flavine-fermenten, nicotinezuuramide van het codehydrogenase; vitamine B_C is waarschijnlijk werkzaam bij de inbouw van het laatste C atoom in het purine skelet, enz. Een mooi voorbeeld is ook het vitamine A, waarvan de rol bij het photochemisch proces der lichtperceptie in de laatste twee jaren op fraaie wijze kon worden vastgesteld. Bij het noemen van deze opvallende successen moet men er zich van bewust blijven, dat men bij de meeste ergonen nog zo ver niet is. Bij een groot aantal vitaminen en vrijwel alle hormonen beperkt onze kennis van de werking zich nog tot het resulterende physiologische of pharmacologische effect. Het valt te betreuren, dat terwijl een zeer groot aantal onderzoekers zich bezig houden met het maken van analoga, varianten en inhibitoren van deze biokatalysatoren, maar weinigen het bereiken van inzicht in het mechanisme van de werking rechtstreeks

najagen. Het dient erkend te worden, dat dit in vele gevallen nog prematuur lijkt en op zijn minst een moeizaam onderzoek zou vereisen, waarvan slechts sporadisch succes binnen afzienbare tijd te verwachten valt.
Toch zijn de mogelijkheden tengevolge van de ontwikkeling van geraffineerde micromethoden op het gebied van de analyse en zuivering de laatste jaren veel gunstiger geworden. De grootste aanwinst der methodiek is wellicht gelegen in de zg. tracer-techniek, waarbij verbindingen of groepen met bepaalde isotopen gemerkt worden teneinde hun lotgevallen bij de chemische omzettingen precies te kunnen volgen. Het is dus niet te verwonderen, dat, toen op het laboratorium voor Organische Chemie te Leiden de werking van het vitamine D als een onderwerp voor toekomstig onderzoek aan de orde werd gesteld, de gedachten allereerst naar de synthese van gemerkt vitamine D uitgingen. Er waren verschillende redenen om uit de vele ergonen, waarvan men nog weinig inzicht in de werking gekregen heeft, juist dit vitamine D uit te kiezen. Een kristallijn vitamine D praeparaat werd voor het eerst in de geschiedenis door twee Nederlandse onderzoekers, Reerink en van Wijk, uit bestraald ergosterol verkregen. Ook daarna heeft de groep, die in den beginne op het laboratorium van de N.V. Philips te Eindhoven, later van de N.V. Philips-Roxane te Weesp, aan het vitamine D werkte, belangrijke successen geboekt. We noemen in dit verband de elegante bereidingswijze van het provitamine D_3, het 7-dehydrocholesterol, welke technische productie op grote schaal mogelijk maakte. Van de vele bij deze onderzoekingen opgedane ervaringen kon door een zeer aangename samenwerking in ruime mate geprofiteerd worden.
Verder was het feit, dat vitamine D nauw verwant is met de steroiden een attractie. Voor alle steroidergonen is het gebrek aan inzicht in het mechanisme een opvallende bijzonderheid, vooral omdat de chemie van deze stoffen als een weliswaar moeilijk, maar op het ogenblik in principe bekend terrein geldt. Het moet niet uitgesloten worden geacht, dat men bij dergelijke lipophiele ergonen met een andersoortige, meer physische, activiteit te maken heeft dan bij de vitaminen van de B-groep bijvoorbeeld. In sommige opzichten lijkt het, of de werking bij het vitamine D iets gemakkelijker in eenvoudige systemen bestudeerd zal kunnen worden dan bij de steroidhormonen. Ons eerste en voornaamste doel is nu geweest een gemerkt vitamine D te synthetiseren. In de literatuur is een zodanige synthese nog niet beschreven. Aangezien het vitamine slechts in zeer kleine

doses wordt toegediend (voor de mens is de dagelijkse behoefte ongeveer 0,01 mg), was het een eis om een praeparaat met een hoog isotoopgehalte te verkrijgen. Verder wilden wij beginnen met het maken van een product, dat op een gedefinieerde plaats in het molecule gemerkt was. In het eerste deel van dit proefschrift wordt de door ons uitgevoerde synthese beschreven van vitamine D_3, waarvan de koolstofatomen op plaats 3 (in ring A) voor een zodanig percentage uit C^{14} bestaat, dat de activiteit, ook na enige verdunning, goed meetbaar is. Toch leek de activiteit voor het vervolgen van de gedetailleerde levensloop bij processen in het levende organisme niet sterk genoeg. We zullen dan ook in de toekomst nog sterkere praeparaten trachten te verkrijgen, door de eis van de localisatie van de activiteit op een bepaalde plaats in het molecule te laten vervallen. Er was echter een vraagstuk, dat met het door ons gemaakte praeparaat fraai kon worden bestudeerd, nl. dat van de resorptie na depotvorming door intramusculaire injectie.

In de geneeskunde wordt reeds verscheidene jaren gebruik gemaakt van de zg. stootbehandeling met vitamine D. Door eenmaal oraal of parenteraal een dosis van 7,5 tot 15 mg vitamine D in olieoplossing toe te dienen, kan een rhachitispatient in korte tijd worden genezen en een gezond kind voor een tijdsduur van 4-7 maanden tegen rhachitis worden beschermd. Het is echter niet onverschillig op welke wijze het vitamine D bij de stoot-behandeling wordt toegediend.

Volgens Jesserer werkt vitamine D sneller na orale toediening dan na intramusculaire inspuiting. Hij geeft daarom aan toediening per os de voorkeur als de meest geschikte therapeutische methode en beveelt de intramusculaire injectie aan bij de rhachitis prophylaxe van gezonde kinderen. Gounelle, Teulon en Pailais hebben aangetoond, dat herhaalde toediening per os van een zeer grote dosis vitamine D snel toxisch werkt, doch dat na intramusculaire inspuiting van dezelfde dosis hiervan weinig te bespeuren valt.

Wij zouden hieruit de conclusie kunnen trekken, dat intramusculair ingespoten in olie opgelost vitamine D slechts langzaam uit de spier wordt opgenomen, Van Niekerk en Bliek hebben proeven genomen met kuikens, waarbij het prophylactisch en therapeutisch effect van oraal en van parenteraal toegediende doses vitamine D_3 op de rhachitis bij die dieren quantitatief werd nagegaan. Het bleek nu o.a. dat de intramusculair toegediende doses een aanzienlijk langerdurend effect hadden dan de oraal gegeven doses. Dit

resultaat is in overeenstemming met de hierboven vermelde hypothese

In hoofdstuk IV geven wij de beschrijving van onze naar aanleiding van dit probleem gedane proeven.

Wij hebben rhachitische en niet-rhachitische kuikens intramusculair ingespoten met een olieoplossing van vitamine D_3 3 C^{14} en op gegeven tijden na de injectie de nog in de spier aanwezige hoeveelheid radioactief materiaal bepaald. Dit bleek gedurende een periode van ongeveer 7 maanden langzaam uit de spier te verdwijnen (zie figuur 18 op blz.121)

Verder hebben wij rhachitische en niet-rhachitische kuikens intramusculair ingespoten met een olieoplossing van kristallijn vitamine D_3. Met behulp van een colorimetrische methode werd op bepaalde tijden na de injectie het nog in de spier aanwezige vitamine D_3 bepaald. Er bleek goede overeenkomst te bestaan tussen de met behulp van de radiometrische en de colorimetrische methode verkregen uitkomsten. Het vitamine D_3 depot bleek bij de rhachitische en bij de niet-rhachitische kuikens ongeveer met dezelfde, opmerkelijk geringe snelheid af te nemen. Aan het einde van het proefschrift wordt zeer in het kort op een mogelijk interpretatie van de verkregen gegevens gewezen.

Een onderzoek, als in dit proefschrift beschreven, kan slechts efficient geschieden door samenwerking van een aantal personen. De dames M.J. van Eijk en J.F. Voorwijk en de Heren M.S. de Groot, K.H. Hanewald, Drs H. Hulleman, H. Humme, K. de Jong, E. van Vliet en P. Westerhof hebben mij door hun medewerking aan de oplossing van vele experimentele problemen in belangrijke mate gesteund. De Heer Drs H. Looyenga heeft enkele theoretische aspecten nader bekeken.

Op deze plaats zij ook de hulp gememoreerd, die ik van de Heren Dr Th.J. de Man, Drs J.R. Roborgh, Drs H.F.L. Scholer en Ir N. Zwiep bij de biologische proeven heb gekregen.

De directie van de N.V. Philips-Roxane ben ik veel dank verschuldigd voor de steun, die mij het verrichten van deze onderzoekingen heeft mogelijk gemaakt. In het bijzonder wil ik de Heren Dr E.H. Reerink en Dr J.A. Keverling Buisman bedanken voor hetgeen ik van hen in wetenschappelijk opzicht heb mogen leren.

De Heren Dr J. van Niekerk, Dr H. Verdam en Dr K.J. Keuning, die gedeelten van het manuscript hebben doorgelezen, dank ik voor hun waardevolle adviezen.

De Heer J.H. Schutte heeft mij zeer geholpen door het maken van de tekeningen.

HOOFDSTUK I

DE SYNTHESE VAN MET C^{14} GEMERKT VITAMINE D_3

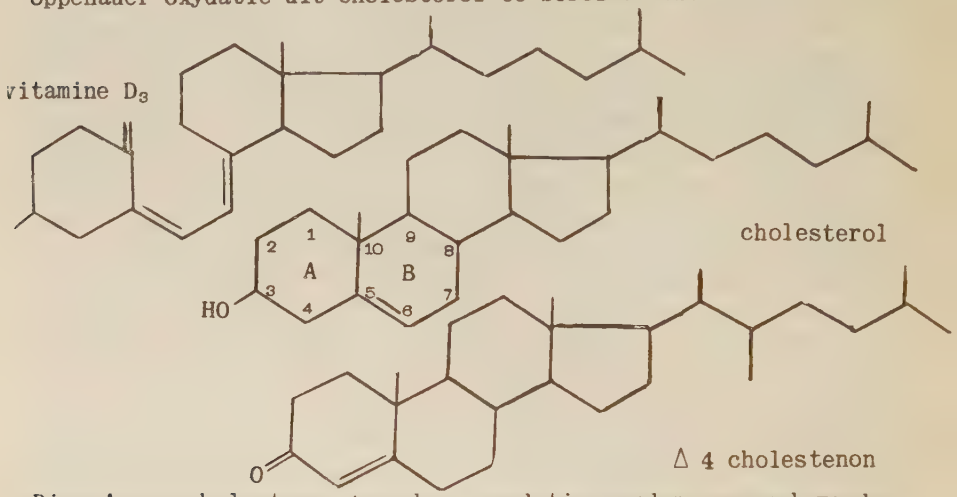
PAR. 1 INLEIDING EN OVERZICHT

Bij de synthese van organische verbindingen, die met een koolstofisotoop gemerkt zijn, moeten in de regel nieuwe C-C banden worden gevormd. Vele bekende reacties uit de synthetische organische chemie kunnen voor dit doel gebruikt worden, hoewel meestal pas na verbetering van de opbrengst en verkleining van de schaal, waarop gewerkt wordt. Aangezien de koolstofisotopen in de regel slechts beschikbaar zijn in de vorm van zeer eenvoudige verbindingen, zoals bijv. $BaCO_3$, staat men voor de taak hieruit een dikwijls vrij gecompliceerde stof te synthetiseren langs een ongebruikelijk lange of onbekende weg. Bovendien krijgt, door de kostbaarheid van de koolstofisotopen, het probleem van het bereiken van goede opbrengsten een speciaal accent.

Wij hebben voor de bereiding van gemerkt vitamine D_3 gebruik gemaakt van het radioactieve C^{14} isotoop. C^{14} is een zwakke β-straler met een maximale energie van 0,156 Me V en een halveringstijd van 5700 jaar. De lange halveringstijd maakt het isotoop, in tegenstelling met het radioactieve C^{11}, zeer geschikt voor de synthese van gemerkte organische verbindingen. Een nadeel is echter dat de zwakke β-straling reeds door dunne vliezen geabsorbeerd wordt. Deze eigenschap maakt het werken met C^{14} tamelijk ongevaarlijk, doch bemoeilijkt de quantitatieve bepaling van de radioactiviteit. Toch kan C^{14} in grotere verdunningen dan het veel gebruikte massaisotoop C^{13} worden aangetoond. Dit motiveert onze voorkeur voor C^{14}.

Hoe moet de synthese nu worden uitgevoerd? Op het ogenblik is van een aantal steroiden de totale synthese bekend, doch door het grote aantal trappen en door het optreden van sterioisomeren is deze niet geschikt voor de bereiding van gemerkte verbindingen. Door echter van een bestaand steroid-molecuul een klein gedeelte te elimineren en daarna bij de reconstructie het isotoop in te bouwen, kunnen stereochemische veranderingen worden vermeden en gemerkte steroiden in een niet al te slechte opbrengst worden gesynthetiseerd. Wanneer wij ons nu tot taak stellen vitamine D_3 in

ring A te merken met C^{14}, dan moet dus uit deze ring tenminste een C atoom worden geëlimineerd en vervangen door C^{14}.
Nu is vitamine D_3 een tamelijk onstabiele verbinding, zodat deze bewerking grote moeilijkheden oplevert. Bij de synthese van vitamine D_3 wordt echter steeds uitgegaan van het stabiele cholesterol. Invoering van een isotoop in ring A van deze laatste verbinding is nu goed mogelijk. Het beste uitgangsmateriaal is Δ 4 cholestenon, dat op eenvoudige wijze door middel van een Oppenauer oxydatie uit cholesterol te bereiden is.

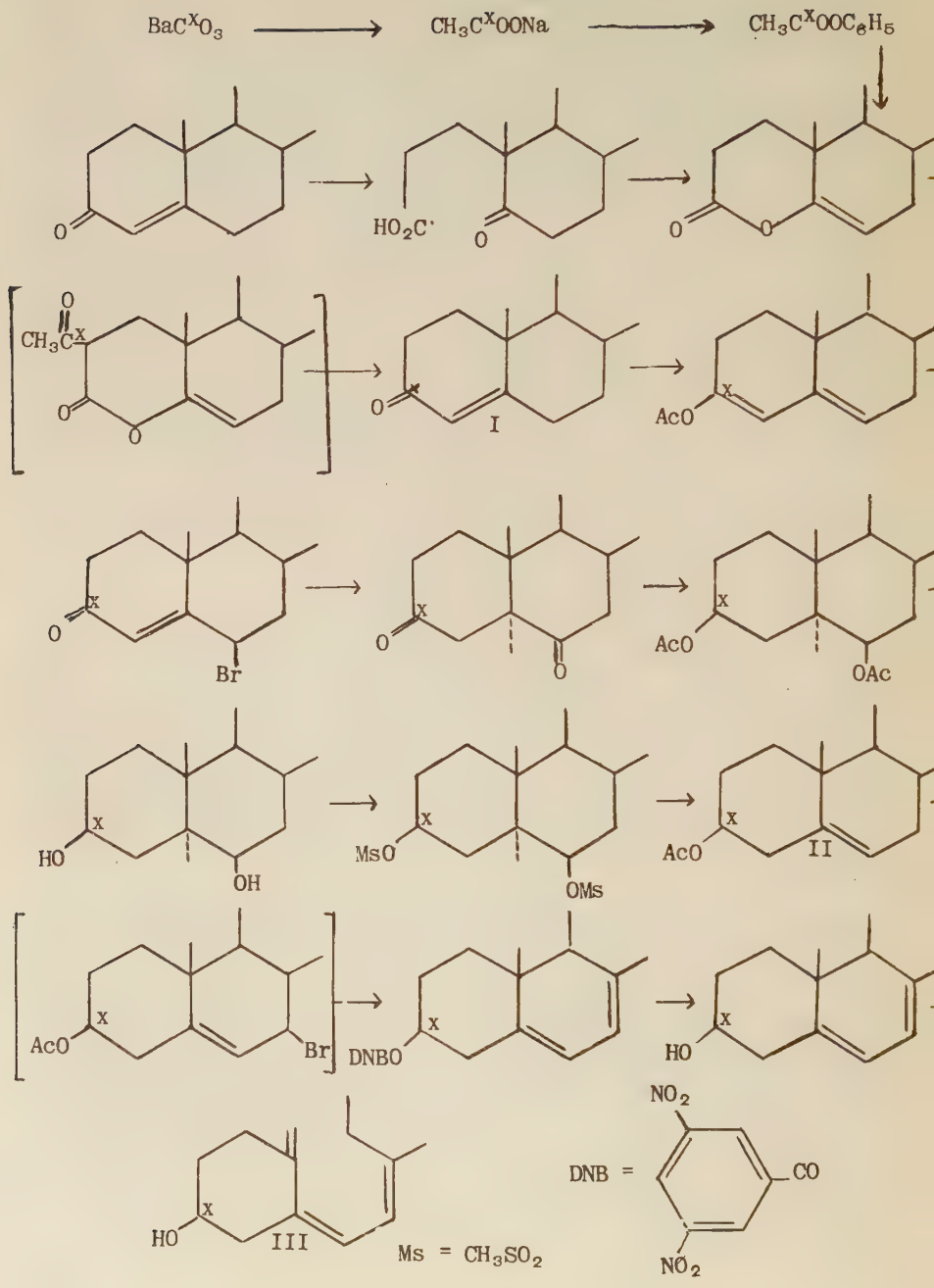


Ring A van cholestenon kan door oxydatie worden geopend zonder de rest van het molecuul te beschadigen. In 1947 publiceerde Turner [1,2] een methode voor de bereiding van gemerkt cholestenon. Door ozonisatie en ontleding van het gevormde ozonide wordt C3 uit ring A van cholestenon geëlimineerd en door middel van een estercondensatie gevolgd door een ringsluiting een C^{14} isotoop ingevoerd. Hierbij ontstaat cholestenon 3 C^{14}. Op dezelfde wijze kan, uitgaande van testosteron, testosteron 3 C^{14} bereid worden. Uit het cholestenon 3 C^{14} is nu het cholesterol 3 C^{14}, de grondstof voor de synthese van vitamine D_3 3 C^{14}, te bereiden. Terwijl echter cholesterol zeer gemakkelijk in cholestenon is om te zetten-daarbij ontstaat immers een geconjugeerd systeem van dubbele banden-levert het omgekeerde proces, dus de reductie van de ketogroep en verschuiving van de dubbele band van Δ 4,5 naar Δ 5,6 veel meer moeilijkheden op.
Met het doel de synthese van 11-dehydrocorticosteron en dergelijke verbindingen te verbeteren, hebben H. Reich en A. Lardon [3] in 1946 een methode ontwikkeld volgens welke de hierboven

genoemde omzetting, hoewel via zes tussenproducten, in redelijke opbrengst kan worden verwezenlijkt.
Wij hebben de synthese van Reich en Lardon op semi-microschaal uitgevoerd en getracht de opbrengst zo hoog mogelijk op te voeren. Cholestenon werd daarbij met 27% opbrengst in cholesterylacetaat omgezet. Toen de voorbereidingen voor de synthese met radioactief materiaal in een vergevorderd stadium waren gekomen, werd in een korte mededeling door W.G. Dauben en J.F. Eastham[4] een nieuwe methode aangegeven voor de omzetting van cholestenon in cholesterol. Deze onderzoekers hebben de methode van Reich en Lardon nagegaan en daarbij slechts een opbrengst van 12% verkregen. Volgens de nieuwe methode zou de omzetting in ongeveer 30% opbrengst verlopen.
Hoewel de methode van Dauben door zijn grotere eenvoud zeer aantrekkelijk is, hebben we toch het procédé van Reich en Lardon gevolgd, omdat dit reeds geheel door ons was uitgewerkt en de opbrengst niet veel minder was dan de door Dauben behaalde. Ons doel was, met behulp van een redelijke methode, in korte tijd gemerkt vitamine D_3 voor biochemisch onderzoek te synthetiseren en het aanbrengen van verbeteringen in de bestaande synthesen was dus voor ons niet het allerbelangrijkste.
Intussen zijn er alweer verschillende verbeteringen van de synthese van gemerkt cholestenon [13,14] en van de omzetting van Δ 4 cholestenon in cholesterol gepubliceerd [5,6,7,8]. Volgens een door Heard[14] aangegeven methode kan op 't ogenblik Δ 4 cholestenon 4 C^{14} in $\pm$ 70% opbrengst, berekend op $C^{14}H_3J$, worden gesynthetiseerd. Turner behaalde slechts 22%, berekend op $CH_3C^{14}OONa$. De omzetting van Δ 4 cholestenon in cholesterol kan volgens Belleau en Gallagher thans in $\pm$ 80% opbrengst worden uitgevoerd.

Ter orientering geven wij op blz.16 een reactieschema van de gehele gang van de synthese zoals deze door ons werd uitgevoerd.

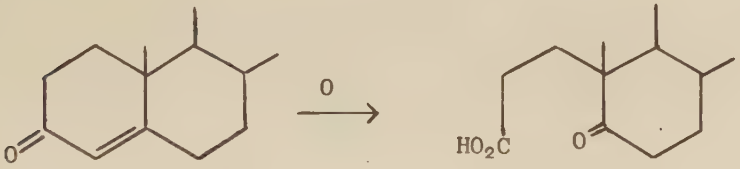
Wij zullen de beschrijving van de synthese van vitamine D_3 3 C^{14} in drie paragraphen verdelen nl. de synthese van cholestenon 3 C^{14} I, de omzetting van cholestenon 3 C^{14} in cholesterylacetaat 3 C^{14} II, en de synthese van vitamine D_3 3 C^{14} III uit cholesterol 3 C^{14}.


BaC^{X}O$_3$
CH$_3$C^{X}OONa
CH$_3$C^{X}OOC$_6$H$_5$
HO$_2$C
I
AcO
Br
OAc
HO
OH
MsO
OMs
II
DNBO
III
Ms = CH$_3$SO$_2$
DNB =
NO$_2$
CO
NO$_2$

PAR. 2 DE SYNTHESE VAN CHOLESTENON 3 C^{14}

A OVERZICHT VAN DE LITERATUUR

In verband met de onderzoekingen over het metabolisme van steroid-hormonen en de invloed van deze stoffen op verschillende vormen van kanker, werd door Turner een methode ontworpen voor de synthese van in ring A gemerkte steroiden. In 1947 werden reeds enige voorlopige mededelingen [1,2] gedaan over de synthese van cholestenon 3 C^{14} en testosteron 3 C^{14}. Een uitgebreide publicatie verscheen echter pas in 1950. Turner beschrijft hierin twee methoden voor het inbouwen van C^{14} in ring A. Steeds wordt uitgegaan van een ketozuur I, het 5 oxo 3,5 seco A norcholestaan 3 carbonzuur [x]), dat in 1906 in slechte opbrengst bereid werd door Windaus[10] door oxydatie van cholestenon met $KMnO_4$. Dorée en Gardner[11] en later Bolt[12] slaagden erin de opbrengst te verbeteren door het cholestenon te ozoniseren en het gevormde ozonide met water te ontleden. Turner verkreeg het ketozuur in 80% opbrengst door behalve ozonisatie ook nog oxydatie met H_2O_2 en HJO_4 toe te passen.

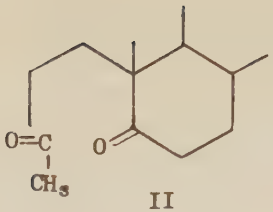


I

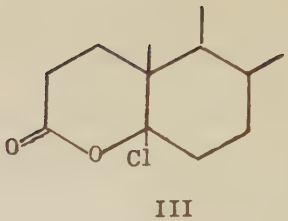
Het lag nu oorspronkelijk in de bedoeling van Turner het ketozuur via het zuurchloride met gemerkt diazomethaan om te zetten in een methylketon II en hieruit door cyclisatie cholestenon 3 C^{14} te bereiden.
Reeds bij de bereiding van het zuurchloride stuitte hij op moeilijkheden, doordat een verbinding ontstond, waarvoor hij, op grond van chemische en physisch chemische onderzoekingen, de structuur III aannam. De verbinding reageerde niet met diazomethaan.

---

[x]) Deze nomenclatuur werd voorgesteld op een conferentie over de nomenclatuur van de steroiden, belegd door de *Ciba Foundation* te Londen van 30 Mei tot 1 Juni 1950. Zie Helv 34, 1680 (1951)

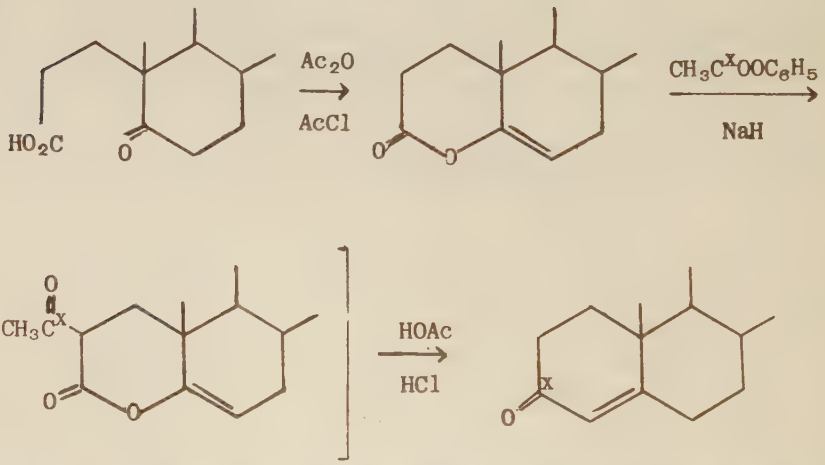


II

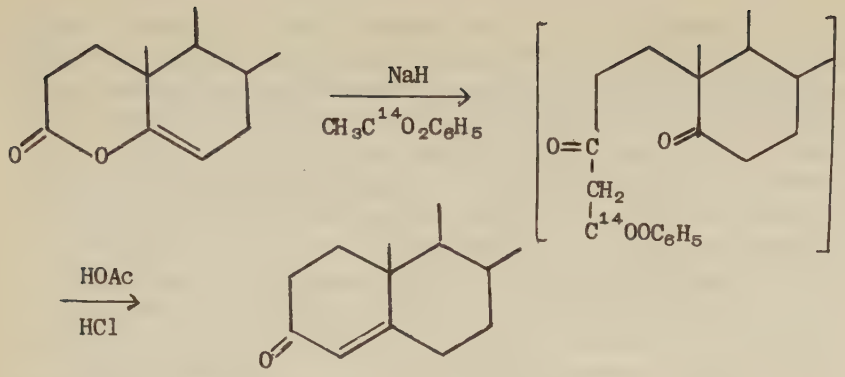


III

Ook een poging om door middel van pyrolyse van het Ba-zout van het ketozuur met Ba-acetaat het methylketon te bereiden mislukte. Goede resultaten werden echter behaald met de volgende synthese:



Het ketozuur werd met azijnzuuranhydride en acetylchloride omgezet in een enol-lacton, het 5 hydroxy 3,5 seco A norcholesteen 3 carbonzuur 3,5 lacton. Deze verbinding werd met phenylacetaat, dat uit $CH_3C^{14}OOH$ gesynthetiseerd was, gecondenseerd onder invloed van NaH. Door het ruwe condensatieproduct te behandelen met verdunde alkali of met geconcentreerd HCl en azijnzuur trad hydrolyse, decarboxylering en cyclisering op. Nadat door wassen met NaOH zure bijproducten waren verwijderd, kon door chromatografie zuiver cholestenon worden verkregen met een radioactiviteit, die ongeveer 90% bedroeg van de op grond van de activiteit van het phenylacetaat berekende.
Dit werd veroorzaakt door het feit, dat ook een kleine hoeveelheid inactief cholestenon ontstond volgens de reactie:



Door bij de synthese gebruik te maken van in de methylgroep gemerkt phenylacetaat zou ook volgens de nevenreactie radioactief cholestenon moeten ontstaan. Turner vond inderdaad met uit gemerkt CH_3J bereid phenylacetaat een 10% hogere activiteit voor het cholestenon.

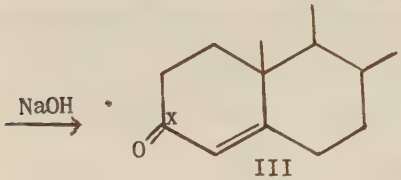
De opbrengst van de estercondensatie, berekend op enol-lacton was 51%, berekend op Na-acetaat 22%. Een groot gedeelte van het radioactieve materiaal wordt dus niet in het steroid-molecuul ingebouwd.

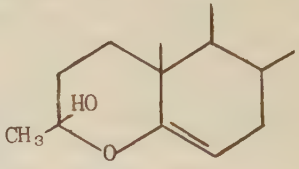
In zijn publicatie geeft Turner nog een tweede procedure voor de synthese van gemerkt cholestenon, waarbij van een Reformatzky reactie wordt gebruik gemaakt. De opbrengsten zijn echter minder. Nadat wij de synthese van cholesterol 3 C^{14} vrijwel beeindigd hadden verscheen in 1951 een publicatie van George I. Fujimoto[13], waarin een verbeterde synthese van gemerkt cholestenon en testosteron wordt besproken. Fujimoto behandelde 5 oxo 3,5 seco A norcholesteen 5-3 carbonzuurlacton met CH_3MgJ en verkreeg na ontleding van de Mg verbinding een stof met smp. 174-178°, waarvoor hij de structuur II aannam. Zoals reeds vermeld, hadden pogingen van Turner tot de synthese van deze verbinding geen resultaat.

I

II

Door behandeling van II met NaOH ontstond cholestenon. De opbrengst berekend op CH_3J was 55%. Door een latere publicatie van R.D.H. Heard en P. Ziegler[14] wordt het twijfelactig, of het door Fujimoto geisoleerde tussenproduct wel de structuur II toekomt. Heard en Ziegler konden na behandeling van het enol-lacton met CH_3MgJ een product isoleren, dat bij 164-175° smolt. Op grond van spectroscopische gegevens nemen zij hiervoor de structuur aan van een hemiacetaal IV. Dat deze verbinding zich in vele opzichten als een diketoverbinding gedraagt (bijv. de vorming van een bisdinitrophenylhydrazon), verklaren zij door isomerisatie van IV naar II, die gemakkelijk optreedt onder invloed van verwarming of behandeling met zuren of alkalien.





IV

Aanwezigheid van II in het door Heard e.a. geisoleerde product zou het grote smelttraject kunnen verklaren. Het is dus heel goed mogelijk, dat Fujimoto en Heard dezelfde stof in handen hebben gehad, alleen in verschillende graden van zuiverheid. Heard is er niet in geslaagd de diketoverbinding in kristallijne vorm te verkrijgen. De opbrengst aan cholestenon 4 C^{14} is volgens Heard 70%, berekend op het ketozuur en eveneens 70%, berekend op CH_3J. De opbrengsten aan cholestenon 3 C^{14} bereid met de phenylacetaat-condensatie en de Reformatzkyreactie volgens Turner zijn resp. 22 en 10%, berekend op Na-acetaat.

B RESULTATEN VAN EIGEN ONDERZOEK

Wij hebben volgens de phenylacetaatcondensatiemethode cholestenon 3 C^{14} bereid en daarbij de resultaten van Turner in grote lijnen kunnen reproduceren. Wij hadden de beschikking over 191 mg Oakridge $BaC^{14}O_3$ met een activiteit van 3 millicurie [x]. Een millicurie C^{14} bevat ca. 0,2 mg C^{14}. De eerste taak was nu uit dit $BaCO_3$, in een zo hoog mogelijke opbrengst phenylacetaat te

[x] 1 m C is die hoeveelheid van een radioactieve stof, waarvan per seconde 3,7 x 10^7 kernen ontleden.

bereiden, dat in de carboxylgroep met C^{14} was gemerkt. Hiertoe hebben wij het $BaC^{14}O_3$ in drie porties van ongeveer 60 mg door middel van een Grignardsynthese omgezet in $CH_3C^{14}OONa$ en dit via acetylchloride veresterd met phenol.

1 De synthese van $CH_3C^{14}OONa$

Door CO_2 te laten reageren met CH_3MgJ en vervolgens het gevormde $CH_3C^{14}OOMgJ$ met zuur te ontleden, ontstaat in de hoofdzaak gemerkt azijnzuur. Er worden echter ook bijproducten gevormd, waarvan ketonen en carbinolen de voornaamste zijn.

$$a\ CH_3MgJ \xrightarrow{C^{14}O_2} CH_3C^{14}OOMgJ \xrightarrow{H^+} CH_3C^{14}OOH$$

$$b\ CH_3C^{14}OOMgJ + CH_3MgJ \longrightarrow (CH_3)_2C^{14}(OMgJ)_2 \xrightarrow{H^+} CH_3C^{14}O\,CH_3$$

$$c\ (CH_3)_3C^{14}(OMgJ)_2 + CH_3MgJ \longrightarrow (CH_3)_3C^{14}OMgJ \longrightarrow (CH_3)_3C^{14}OH$$

Om het optreden van reactie b en c tegen te gaan is het van belang reactie a zo snel mogelijk te doen verlopen bij lage temperatuur. Bij - 20^{o} C neemt het CH_3MgJ reeds voldoende snel CO_2 op. Hoewel met het oog op de nevenreacties een grote overmaat methylmagnesiumjodideoplossing niet gewenst is, werken de meeste onderzoekere toch met overmaat (tot 600%) om een volledige absortpie van het CO_2 te verkrijgen. Verder wordt een CH_3MgJ oplossing van lage concentratie gebruikt, niet alleen om de nevenreacties te onderdrukken, maar ook om het reagens in oplossing te houden. Om de verliezen aan radioactief materiaal zoveel mogelijk te beperken, wordt bij de synthese van alkylcarbonzuren uit alkylmagnesiumhalogenide en $C^{14}O_2$ steeds in gesloten systemen gewerkt. De verschillende apparaturen, die in Isotopic Carbon[15] besproken worden, zijn echter ingewikkeld van constructie en vergen tamelijk grote hoeveelheden $BaC^{14}O_3$. In 1950 hebben van Bruggen, Claycomb en Hutchens[16] een klein, eenvoudig apparaat beschreven, waarin $CH_3C^{14}OONa$ in een opbrengst van 80-90% kon worden bereid in hoeveelheden varierende van 0,25 tot 1,0 mmol. Met behulp van dit toestel hebben wij uitgaande van inactief $BaCO_3$ in ongeveer 80-85% opbrengst CH_3COONa kunnen bereiden. Met $BaC^{14}O_3$ werden iets lagere opbrengsten verkregen (70%). De voornaamste oorzaak hiervan

is o.i. gelegen in het feit, dat bij de synthese met actief materiaal, met het oog op het risico, met kleinere hoeveelheden $BaCO_3$ werd gewerkt, nl. 60 mg tegen 100 mg bij de synthese met inactief materiaal. De verdere details zullen in het experimentele gedeelte van dit hoofdstuk uitvoerig besproken worden. Uitgaande van 190.5 mg $BaC^{14}O_3$ bereidden wij 55 mg $CH_3C^{14}OONa$

2 De synthese van $CH_3C^{14}O-OC_6H_5$

De 55 mg $CH_3C^{14}OONa$ werden verdund met 2,39 g inactief Na-acetaat en daarna met thionylchloride omgezet in acetylchloride. Deze verbinding werd door koken met overmaat phenol in benzeen veresterd tot phenylacetaat. Hoewel Turner[9] een rendement van 91% opgeeft, konden eij aanvankelijk geen hogere opbrengsten verkrijgen dan 59%. Op verschillende manieren, die in het experimentele gedeelte van dit hoofdstuk besproken worden, hebben wij getracht betere resultaten te verkrijgen. De voornaamste oorzaak van de te lage opbrengst bleek gelegen te zijn in het feit, dat phenylacetaat door wassen met loog gemakkelijk verzeept. Door dit wassen, dat noodzakelijk is om de phenol te verwijderen, zoveel mogelijk te beperken, hebben wij uiteindelijk 77,4% opbrengst verkregen. Aangezien wij bij de gefractionneerde destillatie, die voor de zuivering van het phenylacetaat werd toegepast, de laatste resten actief materiaal door nadestilleren van een kleine hoeveelheid inactief phenylacetaat uit het apparaat hebben gespoeld, is de opbrengst aan actief materiaal nog iets hoger. De totale verdunning bedraagt ongeveer 50 maal berekend op Na-acetaat.

3 De synthese van cholestenon 3 C^{14}

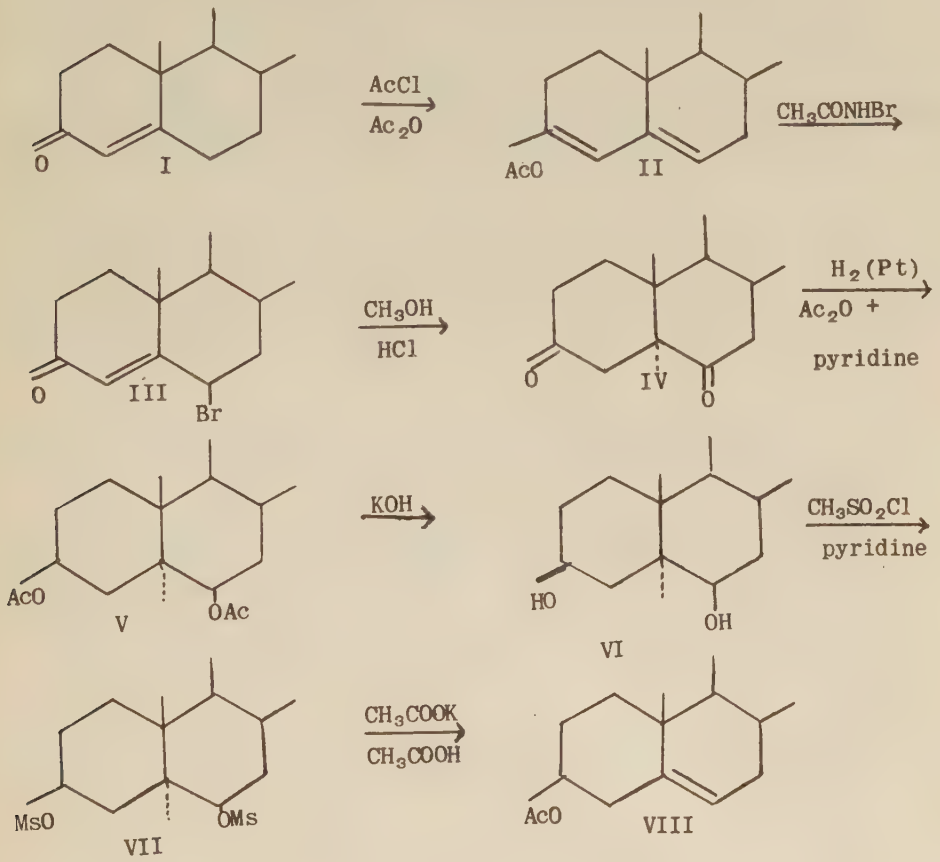
Wij hebben de resultaten van Turner volkomen kunnen reproduceren. Voor de beschrijving van de synthese verwijzen wij naar het experimentele gedeelte. Uiteindelijk werd verkregen, uitgaande van 5,77 g enol-lacton en 4,036 g gemerkt phenylacetaat, 3,25 g cholestenon 3 C^{14} met een activiteit van 5315 ± 150 tikken/min, gemeten na destructie tot $BaCO_3$, in een oneindig dikke laag; (zie Hoofdstuk 2). Dit cholestenon 3 C^{14} bevatte echter nog kleine hoeveelheden van een verontreiniging, , die door kristallisatie of chromatografie kon worden verwijderd.

PAR. 3 DE OMZETTING VAN Δ 4 CHOLESTENON 3 C^{14} IN CHOLESTEROL 3 C^{14}

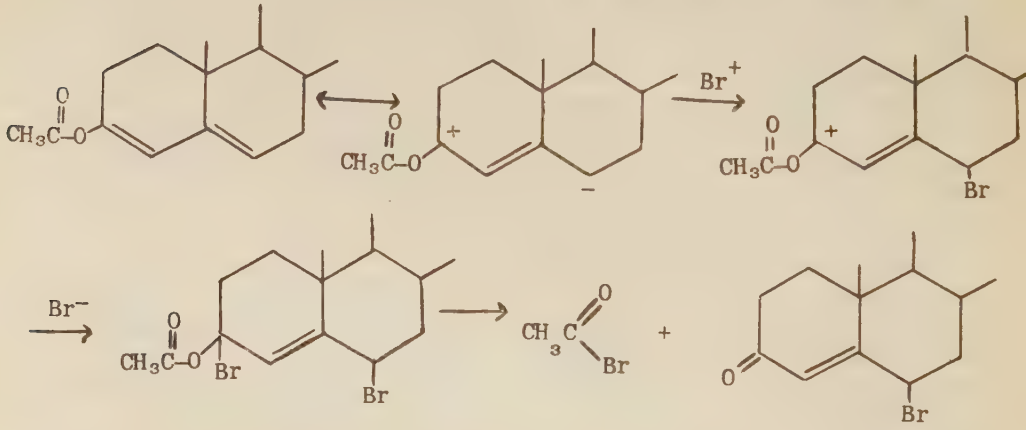
I De methode van Reich en Lardon

A Inleiding

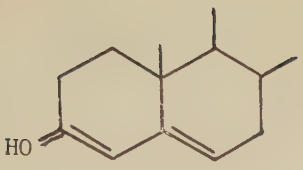
Terwijl cholesterol gemakkelijk in Δ 4 cholestenon is om te zetten, levert het omgekeerde proces, dus de reductie van de ketogroep en verschuiving van de dubbele band van Δ 4-5 naar Δ 5-6, veel meer moeilijkheden op. Met het doel de synthese van 11-dehydrocorticosteron en dergelijke verbindingen te verbeteren, hebben Reich en Lardon[3] een methode ontwikkeld, volgens welke de hierboven genoemde omzetting, hoewel over zes tussenproducten, in een regelijke opbrengst kan worden verwezenlijkt.



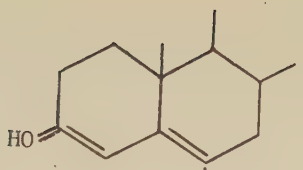
Wanneer cholestenon I in een zo hoog mogelijke opbrengst moet worden omgezet in 6 broomcholestenon III, dan kan dit het beste via het cholestenonenolacetaat II geschieden. Door inwerking van broom op cholestenon ontstaat nl. een product, dat per molecuul meerdere broomatomen bevat. Weliswaar is Inhoffen[19] er in 1949 in geslaagd om door directe bromering van cholestenon met broomsuccinimide 6 broomcholestenon te bereiden, doch de opbrengst bedroeg slechts 40-60%.
Inhoffen[17] voerde de bromering van cholestenonenolacetaat uit in aether-azijnzuur waaraan kaliumacetaat was toegevoegd. Een mogelijk reactiemechanisme wordt door onderstaand schema weergegeven:



Bij afwezigheid van K-acetaat worden meerdere broomatomen opgenomen. Inhoffen geeft van dit verschijnsel de volgende verklaring:
Cholestenon, resp. 6-broomcholestenon kan slechts via de enolvormen IX, resp. X met broom reageren. Het keto-enolevenwicht, dat steeds zeer sterk naar de kant van ketoverbinding verschoven ligt, zou zich instellen onder de katalytische invloed van HBr. Wanneer het HBr door kaliumacetaat wordt weggenomen, kan dus geen bromering van cholestenon, of 6-broomcholestenon plaatsvinden.
Cholestenonenolacetaat daarentegen kan ook in aanwezigheid van kaliumacetaat met broom reageren, omdat hier reeds een enolvorm aanwezig is.
Het gevormde 6-broomcholestenon kan echter niet meer verder reageren.



IX

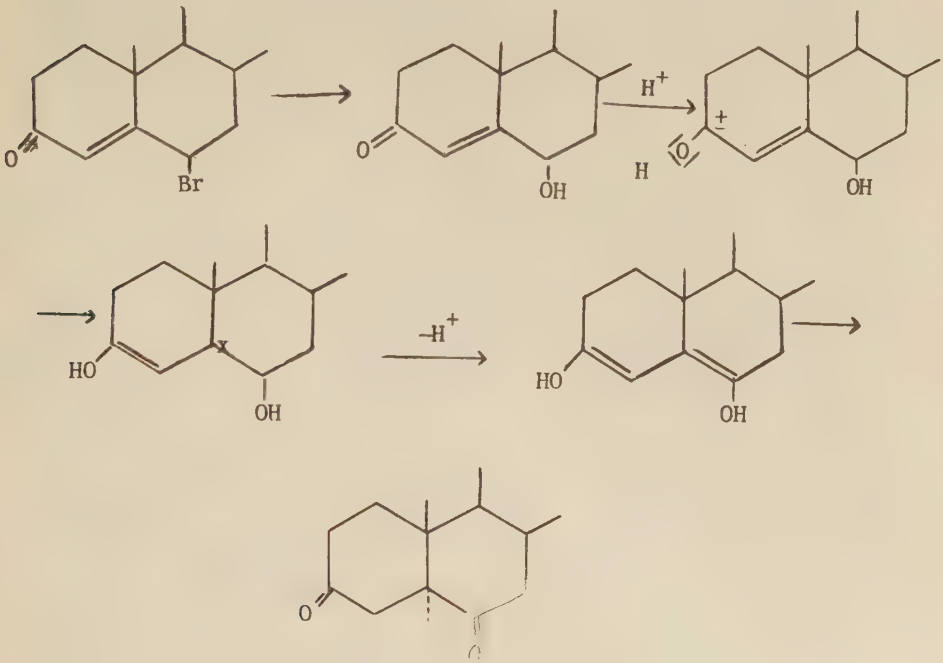


X

Een elegante methode voor de bereiding van 6-broomcholestenon wordt door Reich en Lardon[3] aangegeven. Deze onderzoekers hebben cholestenonenolacetaat in ongeveer 90% opbrengst in 6 broomcholestenon kunnen omzetten door bromering met N-broomaceetamide in aceton-water of butanol-water.

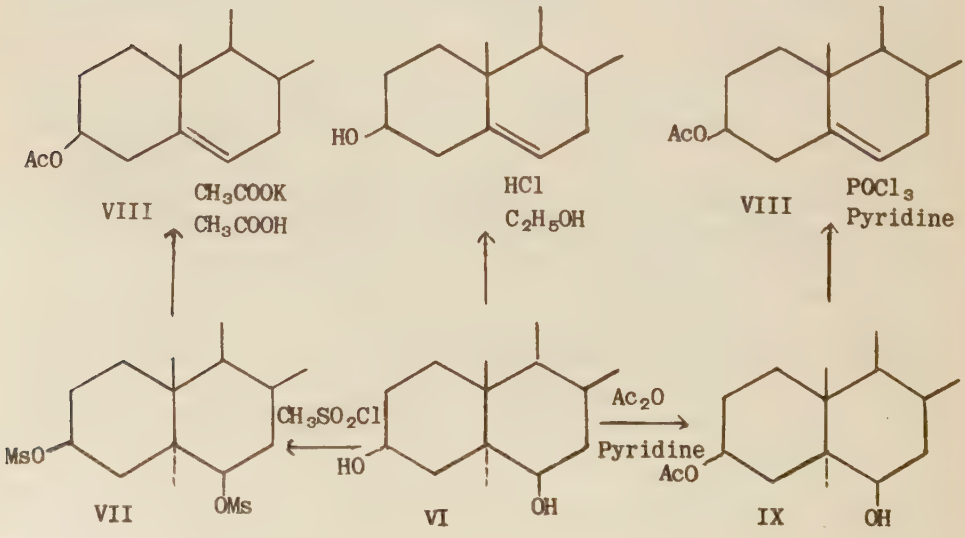
Met cholestenonenolacetaat kan in 90% opbrengst bereid worden volgens de door Westphal[18] aangegeven methode, waarbij cholestenon gedurende 1½ uur met acetylchloride en azijnzuuranhydride op 95-105° wordt verhit.

Volgens Dane[20] gaat 6-broomcholestenon door koken met 0,1 N alcoholisch HCl over in cholestaandion 3,6 IV. Een mogelijk reactiemechanisme geven wij in onderstaand schema weer:

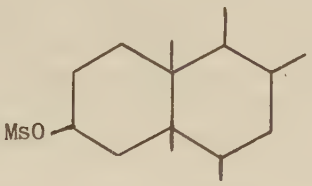


Door hydrogenering van cholestaandion 3,6 met Pt als katalysator ontstaat voornamelijk cholestaandiol 3β, 6β, dat het beste als diacetaat gezuiverd kan worden. Hiertoe wordt het ruwe hydrogeneringsproduct met azijnzuuranhydride en pyridine geacetyleerd, waarna door middel van verscheidene kristallisaties en chromatografie het zuivere cholestaandiol 3β, 6β diacetaat V kan gewonnen worden. Deze verbinding laat zich met methylalcoholische KOH gemakkelijk verzepen tot cholestaandiol 3,6 VI Als bijproducten hebben Reich en Lardon nog kleine hoeveelheden cholestanol 6 acetaat, cholestaandiol 3β, 6α diacetaat en cholestanol 3β 6 on acetaat kunnen isoleren.

Het cholestaandiol 3β, 6β kan op verschillende manieren in cholesterol worden omgezet. De OH groep aan C6 laat zich reeds door koken met alcoholische HCl afsplitsen, doch de opbrengst aan cholesterol is dan laag. Het is ook mogelijk het cholestaandiol 3,6 door voorzichtige acetylering met azijnanhydride in pyridine om te zetten in cholestaandiol 3,6 monoacetaat 3 IX Uit deze laatste verbinding ontstaat door dehydratering met $POCl_3$ in pyridine in goede opbrengst cholesterylacetaat VIII. De bereiding van het monoacetaat is echter niet eenvoudig, omdat steeds als bijproduct ook diacetaat ontstaat, dat weliswaar chromatografisch van het monoacetaat is te scheiden, maar toch de opbrengst ongunstig beinvloedt.



De beste resultaten worden bereikt door omzetting van cholestaan-diol 3,6 met mesylchloride (methaansulfonylchloride) in een dimesylaat VII, waaruit door koken met zilveracetaat of kalium-acetaat in azijnzuur in goede opbrengst cholesterylacetaat VIII ontstaat. Bij deze reactie wordt dus de mesylgroep aan C3 door een acetylgroep vervangen en de mesylgroep aan C6 afgesplitst, onder vorming van een dubbele band. Het is interessant, dat bij deze reactie geen Waldense omkering aan C3 optreedt. Shoppee [21] verklaart dit door aan te nemen, dat eerst volgens een E_1 mechanisme methaansulfonzuur wordt afgesplitst, waardoor de Δ 5-6 dubbele band ontstaat en dat daarna door unimoleculaire acetolyse (S_N1) de mesylgroep aan C3 door een acetylgroep wordt vervangen.
Wanneer echter een verbinding van het in formule VIIa getekende type met kaliumacetaat of zilveracetaat in azijnzuur wordt behandeld, dan treedt wel Walden inversie aan C3 op.



VIIa

Shoppee meent, dat bij deze verbinding primair omestering aan C3 optreedt volgens een S_N2 mechanisme en dat daarna pas de dubbele band gevormd wordt. Dat in het tweede geval de eliminering van het methaansulfonzuur het langzaamste proces is, vindt volgens Shoppee zijn oorzaak in het feit, dat we thans te maken hebben met ciseliminering, terwijl in een polair medium bij voorkeur transeliminering optreedt. Wanneer wij formule VII vergelijken met formule VIIa, dan zien wij, dat het H atoom aan C5 in formule VII trans en in formule VIIa cis staat ten opzichte van de mesylgroep aan C6.

B Resultaten van eigen onderzoek

Met inactief materiaal hebben wij de methode van Reich en Lardon nauwkeurig nagegaan en getracht de opbrengsten zo hoog mogelijk

op te voeren. Uiteindelijk hebben wij bij de verschillende trappen de volgende resultaten verkregen:

Tabel I

omzetting	opbrengst
cholestenon → cholestenonenolacetaat	90,2%
cholestenonenolacetaat → 6 Broomcholestenon	89,7%
6 Broomcholestenon → cholestaandion 3,6	76,1%
cholestaandion 3,6 → cholestaandiol 3,6 diacetaat	87,2%
cholestaandiol 3,6 diacetaat → cholestaandiol 3,6	88,5%
cholestaandiol 3,6 → cholestaandiol 3,6 dimesylaat	89 %
cholestaandiol 3,6 dimesylaat → cholesterylacetaat	64,1%

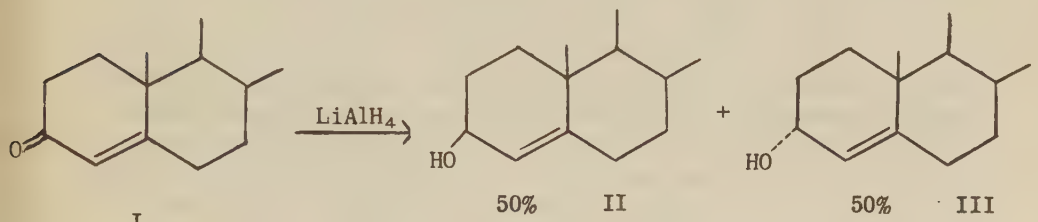
Cholestenon kon dus in 27% opbrengst in cholesterylacetaat worden omgezet. Dauben en Eastham, die de methode van Reich en Lardon hebben nagewerkt, verkregen slechts 12% opbrengst. Hoewel Reich en Lardon niet bij alle trappen een opbrengst vermelden, zijn hun resultaten ongetwijfeld veel gunstiger dan die van Dauben en Eastham. In het algemeen verliepen de reacties op de door Reich en Lardon aangegeven wijze. Enkele moeilijkheden, die wij hebben ondervonden, worden in het experimentele gedeelte van dit hoofdstuk besproken.
Bij de synthese met radioactief materiaal hebben wij de hierboven genoemde opbrengsten niet kunnen halen, omdat het volgens Turner bereidde cholestenon 3 C^{14} nog een onzuiverheid bevatte. Hierdoor i vooral de bereiding van cholestenonenolacetaat en de katalytische hydrering van het cholestaandion 3,6 in minder goede opbrengst verlopen. Uiteindelijk werd verkregen 300 mg zuiver cholesterylacetaat met een activiteit van 5400 (±50) tikken/min. gemeten in een "oneindig dikke" laag $BaCO_3$.

II De methode van Dauben en Eastham

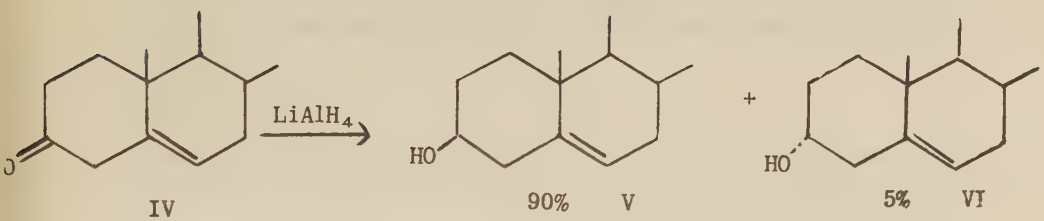
A Inleiding

Nadat we de methode van Reich en Lardon vrijwel hadden uitgewerkt, verscheen een mededeling van W.G. Dauben en J.F. Eastham [4], waarin een kortere methode werd aangegeven voor de omzetting van cholestenon in cholesterol. Het gehele onderzoek werd echter pas tegen het einde van 1951 gepubliceerd. Volgens de nieuwe methode

zou in een opbrengst van ongeveer 30% cholestenon in cholesterol omgezet kunnen worden.
Bij de synthese van cholesterol uit Δ 4 cholestenon kunnen wij twee problemen onderscheiden, nl. de reductie van de ketogroep en de verschuiving van de dubbele band van Δ 4-5 naar Δ 5-6. Reductie van de ketogroep van Δ 4 cholestenon met $LiAlH_4$ geeft volgens McKennis en Gaffney[22] een mengsel van gelijke delen α en β Δ 4 cholestenol II en III.



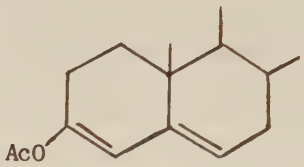
I. 50% II 50% III



IV 90% V 5% VI

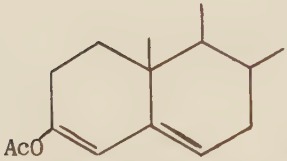
Shoppee en Summers[23] hebben bij de reductie van Δ 5 cholestenon 3 IV echter voornamelijk het β isomeer (cholesterol) V verkregen. Door een omzetting van Δ 4 cholestenon 3 in Δ 5 cholestenon 3 gevolgd door een reductie met $LiAlH_4$ moet het dus mogelijk zijn om uit Δ 4 cholestenon cholesterol te bereiden. Aangezien echter door het bezit van een geconjugeerd systeem van dubbele banden het Δ 4 cholestenon thermodynamisch stabieler is dan het Δ 5 isomeer, levert deze omzetting veel moeilijkheden op. Onder invloed van zuren of alkalien isomeriseert Δ 5 cholestenon snel tot Δ 4 cholestenon. Zoals reeds op blz. 25 vermeld werd, ontstaat door acetylering van cholestenon het cholestenonenol-acetaat VII. Deze verbinding heeft reeds een Δ 5-6 dubbele band. Het probleem is nu uit cholestenonenolacetaat Δ 5 cholestenon 3 of, wat nog beter is, cholesterol te bereiden. Inhoffen[24] e.m.

hebben VII met waterstof en Pt gehydrogeneerd en hierbij slechts cholestaan verkregen.

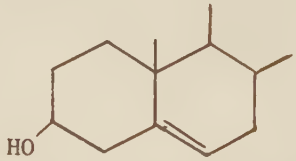


VII

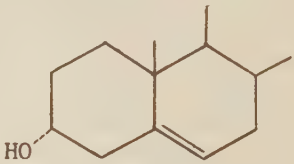
Birch[8] is er in 1950 (zijn publicatie verscheen ongeveer tegelijk met de korte mededeling van Dauben) in geslaagd om uit cholestenonenolacetaat met KNH_2 vloeibare ammoniak Δ 5 cholestenon 3 te bereiden, welke verbinding met $LiAlH_4$ volgens de door Shoppee en Summers aangegeven methode in cholesterol kon worden omgezet. Dauben en Eastham hebben VII direct met $LiAlH_4$ gereduceerd en hierbij een mengsel verkregen van 34% cholesterol V, 15% epicholesterol VI, 32% Δ 4 cholestenon I en waarschijnlijk 4% Δ 4 cholesteen 3 βol II en 4% Δ 4 cholesteen 3αol III.



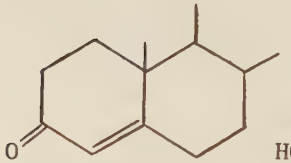
VII



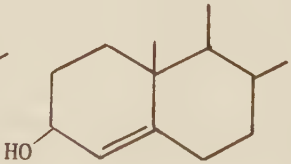
V



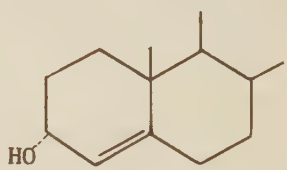
VI



I



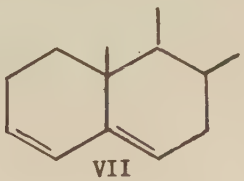
II



III

Dit tamelijk ingewikkelde mengsel laat zich met digitonine in een α en een β fractie splitsen. Met digitonine kunnen nl. de 3β hydroxysteroiden II en V en het Δ 4 cholestenon I in de vorm van een molecuulverbinding, het zg. digitonide, worden neergeslagen.

De digitonidevorming van cholestenon is in 1947 door Haslewood [25] aangetoond. Dit is een van de uitzonderingen op de regel, dat in het algemeen steroiden een 3β OH groep zouden moeten bezitten, teneinde onoplosbare digitoniden te vormen. Cholesterol kan nu op de volgende wijze uit het complexe digitonide worden geisoleerd. Het digitonide wordt opgelost in pyridine. Hierdoor valt de molecuulverbinding weer in de componenten uiteen. Het digitonine kan met aether worden neergeslagen en afgecentrifugeerd. Het mengsel van cholesterol, cholestenon en Δ 4 cholestenol 3 wordt nu met verdund alcoholische HCl gerefluxt. Hierdoor gaat volgens Schoenheimer en Evans[26] het Δ 4 cholestenol 3β over in Δ 2,4 cholestadieen, wat volgens Stavely en Bergmann[27] onder invloed van het HCl isomeriseert tot Δ 3,5 cholestadien VII. Cholesterol en cholestenon worden bij deze bewerking niet aangetast.



VII

Op grond van de vorming van Δ 3,5 cholestadien hebben Dauben e.m. besloten tot de aanwezigheid van de beide Δ 4 cholestenol 3 isomeren in het ruwe reductieproduct, hoewel de directe isolering van deze verbindingen tot nu toe niet gelukt is. Met behulp van chromatografie over Al_2O_3 kan het cholesterol van het cholestenon en het Δ 3,5 cholestadien worden gescheiden. Wanneer de dehydratering met alcoholisch HCl achterwege wordt gelaten, dan is het cholesterol zeer moeilijk in zuivere toestand te verkrijgen, vermoedelijk dus door de verontreiniging met Δ 4 cholestenol 3β. Het Δ 3,5 cholestadien wordt door het ontbreken van een OH groep veel minder sterk aan Al_2O_3 geadsorbeerd, zodat de chromatografische scheiding van de drie componenten in het mengsel goed mogelijk is. Op ongeveer dezelfde wijze als het cholesterol kan uit de α-fractie het epicholesterol worden geisoleerd. Het is merkwaardig, dat, wanneer de reductie *omgekeerd* wordt uitgevoerd, dus wanneer de $LiAlH_4$ oplossing langzaam bij de enolacetaat oplossing wordt gebracht, de vorming van de Δ 4 cholestenol 3 isomeren uitblijft en het cholesterol direct door chromatografie van de β-fractie gewonnen kan worden.

B Reactiemechanisme

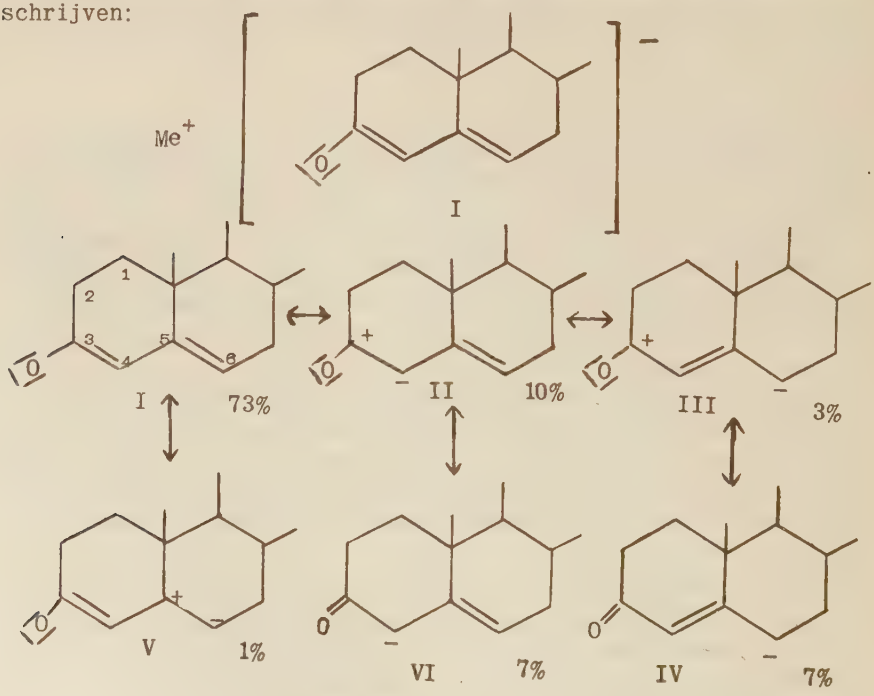
Hoe moeten wij ons de reductie van cholestenonenolacetaat met $LiAlH_4$ voorstellen?

Volgens Nystrom en Brown[28] is er voor de reductie van 1 mol ester 0,5 mol $LiAlH_4$ nodig. Volgens de reactie:

$RCOOR' \longrightarrow RCH_2OH + R'OH$

moeten vier waterstofatomen worden opgenomen. Hiervan zijn slechts de vet gedrukte verschaft door het $LiAlH_4$, terwijl de aan de zuurstof gebonden waterstofatomen afkomstig zijn van het H_2O waarmede de door de reductie gevormde metaalalcoholaten zijn ontleed.

Bij de reductie van cholestenonenolacetaat met $LiAlH_4$ ontstaat waarschijnlijk in eerste instantie een alcoholaat van het door formule I aangegeven type. Hoewel $LiAlH_4$ in het algemeen dubbele koolstof-koolstof banden niet aantast, komen uitzonderingen voor; zo wordt bij cholestenonenolacetaat min of meer schijnbaar ook de Δ 3,4 dubbele band gereduceerd. Hierbij ontstaan verschillende producten, waarvan we het ontstaan enigszins kunnen begrijpen door de volgende grensstructuren voor het negatieve ion op te schrijven:

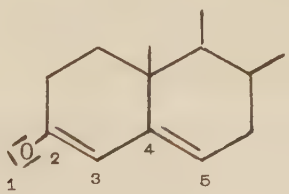


Het lijkt niet onwaarschijnlijk, dat wij bij de reductie met $LiAlH_4$ primair te maken hebben met een nucleophile attaque van het AlH_4^- ion[29]. We zouden ons kunnen voorstellen, dat bij de reductie van het mesomere ion het AlH_4^- ion een H^- ion addeert aan C3 en dat tegelijkertijd het Al zijn electronenoctet weer compleet maakt met het electronenpaar aan C4 of C6. Door ontleding van de aldus gevormde metaalcomplexen met H_2O zou cholesterol, epicholesterol, Δ 4 cholesteen 3 βol en Δ 4 cholestee 3 αol ontstaan. De aanwezigheid van ongeveer 30% Δ 4 cholestenon in het reactie-mengsel moet waarschijnlijk aan een onvolledige reductie van het mesomere ion worden toegeschreven. Door ontleding met verdund zuur van het alcoholaat I ontstaat, via de enolvorm, Δ 5 cholestenon, dat echter in het zure milieu snel tot Δ 4 cholestenon isomeriseert.
Het optreden van koolstof-metaalbanden bij reducties met $LiAlH_4$ is door Hochstein en Brown[30] aannemelijk gemaakt voor de reductie van kaneelaldehyde.

$$C_6H_5CH{=}CCHO \xrightarrow{LiAlH_4} LiAl\,(OCH_2CH_2CCHC_6H_5)_2$$

Door hydrolyse met D_2O ontstaat $DO\text{-}CH_2CH_2C^H_D\text{-}C_6H_5$. De koolstof metaalband is waarschijnlijk een C-Al band en niet een C-Li band omdat CO_2 op de verbinding niet inwerkt.

De heer H. Looyenga, chem. dr heeft voor ons met behulp van de molecular orbital methode de lading uitgerekend op het zuurstofatoom en de koolstofatomen 2,3,4 en 5 van het mesomere ion. Wij laten hier de berekening in het kort volgen.



De twee p-electronen van het zuurstofatoom met de symmetrieas loodrecht op het vlak van het molecuul en de vier π-electronen van de twee dubbele banden kunnen zich over het zuurstofatoom en de koolstofatomen 2,3,4 en 5 bewegen evenals de π electronen in benzeen[31]. De golffunctie van een dergelijk electron is te benaderen met een lineaire combinatie van atomic orbitals.

$$\psi = a_1\varphi_1 + a_2\varphi_2 + a_3\varphi_3 + a_3\varphi_3 + a_4\varphi_4 + a_5\varphi_5$$

Zo'n golffunctie wordt een molecular orbital (M.O.) genoemd. De coefficienten a_i zijn met behulp van de variatiemethode[32] te berekenen. In aansluiting bij Coulson en de Heer[33] worden hiertoe de Coulomb-integralen van de C atomen q en van het O atoom q + 2β gesteld; alle uitwisselingsintegralen tussen naburige atomen worden β gesteld. Wanneer we verder nog aannemen, dat de atomic orbitals genormeerd en orthogonaal zijn, wordt de seculairvergelijking:

$$\begin{vmatrix} x+2 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & x & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & x & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & x & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & x \end{vmatrix} = 0, \text{ waarbij } x = \frac{q - E}{\beta}$$

Hieruit volgt $x^5 + 2x^4 - 4x^3 - 6x^2 + 3x + 2 = 0$ (1)

Daar $E=q - x\beta$, geeft de laagste x de laatste energie. Tengevolge van het Pauli principe kunnen we in een bepaalde energieniveau slechts twee electronen onder brengen, zodat we de drie laagste energieniveau's nodig hebben, wat neerkomt op het bepalen van de drie laagste wortels van de vijfde graadsvergelijking. Deze zijn: 0,425; -1,496; -2,499.

Nu moeten de coefficienten a_1, a_2 enz. voor ieder energieniveau bepaald worden. Hiervoor zijn vijf homogene vergelijkingen ter beschikking:

$$(x+2)a_1+a_2=0 \qquad a_3+xa_4+a_5=0$$
$$a_1+xa_2+a_3=0 \qquad a_4+xa_5=0$$
$$a_2+xa_3+a_4=0$$

We stellen nu voorlopig $a_1=1$ en vinden dan:

$$a_2=-(x+2) \qquad a_3=(x^2+2x-1) \qquad a_5=\frac{a_3}{x^2-1} \qquad a_4=-xa_5$$

Het is mogelijk om voor ieder van deze coefficienten nog een andere uitdrukking in x te vinden. Stellen we deze twee aan elkaar gelijk, dan vinden we (1) weer terug, hetgeen te verwachten was. We moeten de zo gevonden M.O. nog normeren. Dit is te bereiken door te delen door $\sqrt{\sum_i a_i^2}$. We krijgen dan de juiste coefficienten a'_i.

$$a'_i = \frac{a'_i}{\sqrt{\sum_i a'^2_i}}$$

a'^{2}_{i} geeft nu de kans het electron op atoom i aan te treffen. Door deze bij een bepaald atoom over alle electronen te sommeren, vinden we de effectieve π electronenlading ter plaatse van dat atoom[34]. De resultaten in ons geval worden door tabel II weergegeven.

Tabel II

	voor x=-0,425	voor x=-1,496	voor x=-2,499	2x de som over de energieniveau's
a_1	+1,000	+1,000	+1,000	
a_2	-1,575	-0,504	+0,449	
a_3	-1,669	-1,754	+0,247	
a_4	-0,866	+2,120	-0,117	
a_5	+2,038	-1,417	+0,047	
$\sum_i a_i^2$	11,170	10,833	1,326	
a'^2_1	0,090	0,092	0.754	1,872
a'^2_2	0,222	0,023	0,188	0,866
a'^2_3	0,067	0,284	0,046	1,158
a'^2_4	P,PYU	0,415	0,011	0,986
a'^2_5	0,372	0,185	0,002	1,118

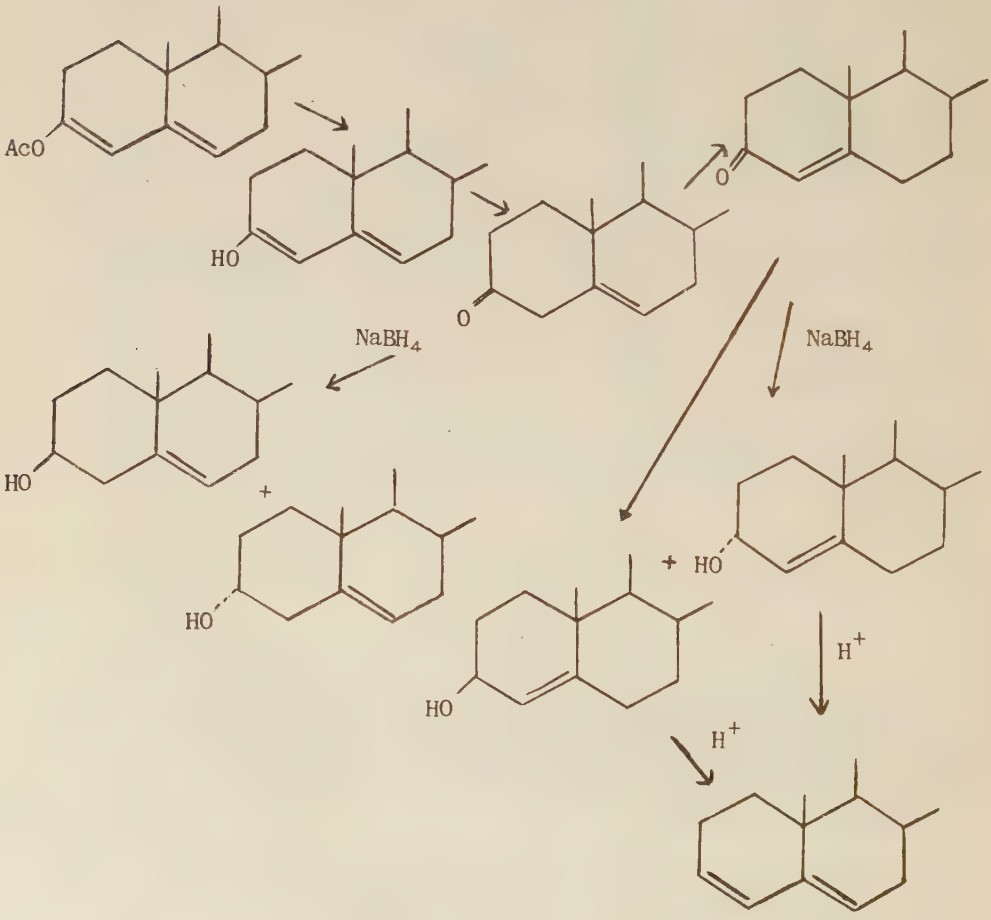
Om de werkelijke lading te vinden, moet nog bij ieder atoom 1 electronenlading worden afgetrokken. Het resultaat is dan als volgt:

1	2	3	4	5
O ——	C ——	C ——	C ——	C
-0,87	+0,13	-0,17	+0,01	-0,12

Met behulp van deze gegevens is het mogelijk een ruwe schatting te maken van de bijdragen, welke de verschillende grensstructuren leveren tot de electronenconfiguratie van het mesomere ion.
Wij hebben door enig proberen de percentages gevonden, die in het schema op blz. 32 staan aangegeven.

De opbrengst van de reductie van cholestenonenolacetaat kan van 35% tot ongeveer 60-85% worden opgevoerd door in plaats van $LiAlH_4$ in aether $NaBH_4$ in absolute aethanol, methanol-water of aethanol-water te gebruiken.[5,6,7]. De nieuwe methode is experimenteel eenvoudiger, omdat nu niet meer onder anhydrische

condities behoeft te worden gewerkt. Het reactiemengsel van de reductie met $NaBH_4$ verschilt belangrijk van dat van de reductie met $LiAlH_4$. Aangezien esters door $NaBH_4$ niet worden aangetast, wordt het cholestenonenolacetaat waarschijnlijk eerst door solvolyse (hydrolyse) omgezet in Δ 5 cholestenon. Deze verbinding wordt nu zo snel door het $NaBH_4$ gereduceerd, dat ondanks het optreedt. Kleine hoeveelheden Δ 4 cholestenolen zijn echter in de vorm van Δ 3,5 cholestadien aan te tonen. Wij kunnen het volgende reactieschema opstellen:



Met uitzondering van Δ 4 cholestenon worden dus dezelfde producten verkregen als bij de reductie met $LiAlH_4$.

C Resultaten van eigen onderzoek

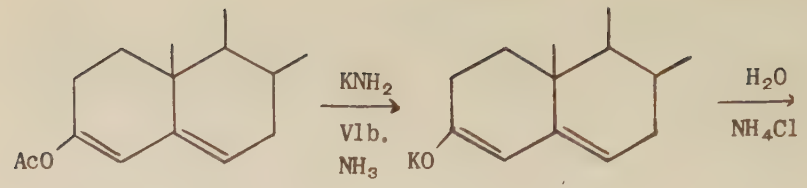
In samenwerking met de heer H. Hulleman, chem. cand., en de heer H.Humme, chem. cand. hebben wij, met behulp van de schaarse gegevens in de korte mededeling van Dauben, cholestenonenol-acetaat met $LiAlH_4$ gereduceerd en hierbij inderdaad een kleine hoeveelheid cholesterol verkregen. De opbrengst was echter veel te laag (ongeveer 6%).Wij hebben dit toegeschreven aan een te korte reactietijd en onvoldoende kwaliteit van de $LiAlH_4$ oplossing. Uit de volledige publicatie, die einde 1951 verscheen[5], bleek dat Dauben e.m. de reductie in ongeveer 20 uur hebben uitgevoerd en daarbij gebruik gemaakt hebben van een volkomen heldere $LiAlH_4$ oplossing, In verband met het gemakkelijk optreden van isomerisatie van Δ 5 cholestenon naar Δ 4 cholestenon onder invloed van zuren of alkaliën, zouden wij ons kunnen voorstellen, dat sporen metaaloxyden of hydroxyden de opbrengst aan cholesterol ongunstig beinvloeden. Aangezien wij volgens de methode van Reich en Lardon in een opbrengst van 27% cholesterylacetaat hadden bereid en het volgens Dauben gesynthetiseerde cholesterol voor de vitamine D_3 synthese altijd eerst nog geacetyleerd zou moeten worden, maakten de twee methoden wat de opbrengst betreft voor ons niet veel verschil en hebben wij bij de synthese met radioactief materiaal toch de methode van Reich en Lardon toegepast, omdat deze reeds geheel door ons was uitgewerkt. De onderzoekingen over de reductie met $LiAlH_4$ hebben wij voorlopig uitgesteld.

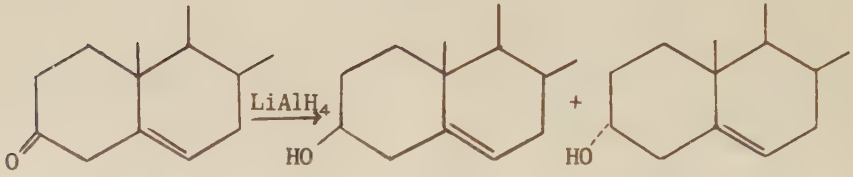
III De methode van Birch

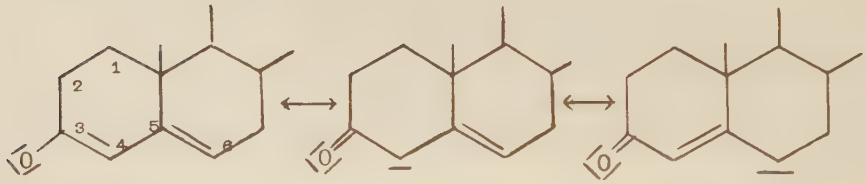
Volgens Birch[8] ontstaat door behandeling van cholestenonenol-acetaat met KNH_2 in vloeibare NH_3 het K-enolaat van cholestenon. Door ontleding van deze verbinding met water, waaraan NH_4Cl is toegevoegd om de vrijkomende alkali te binden, ontstaat Δ 5 cholestenon, dat op de gewone wijze met $LiAlH_4$ gereduceerd kan worden.

Het feit, dat bij de ontleding van het K-enolaat vooral het ongeconjugeerde keton Δ 5 cholestenon ontstaat en in mindere mate het thermodynamisch stabielere Δ 4 cholestenon verklaart Birch op de volgende wijze. Bij de ontleding van het K-enolaat wordt een proton geaddeerd aan een negatief geladen mesomeer ion.

Wanneer nu de additie van het proton irreversibel plaats vindt, dus







wanneer de protondonor veel sterker zuur is dan het gevormde keton, dan zal voornamelijk het ongeconjugeerde keton ontstaan. Het is hier een kwestie van reactiesnelheid en niet van evenwicht, welke verbinding ontstaat. Het proton zal zich het snelst binden op die plaats in het ion, waar de ladingsdichtheid het grootste is. Wanneer we alleen de koolstofatomen beschouwen, dan is de negatieve ladingsdichtheid het grootste op C4 (vergel. blz. 35).

Hoewel de negatieve ladingsdichtheid op het zuurstofatoom nog aanzienlijk groter is, lijkt het niet waarschijnlijk, dat eerst de enolvorm ontstaat, omdat de overgang in de ketovorm toch altijd weer via het ion gaat. Misschien mogen we hier een vergelijking maken met andere gebieden van de scheikunde. De dissociatieconstanten van bijv. water resp. phenol zijn veel groter dan de dissociatieconstanten van methaan resp. tolueen.

Volgens Birch is water voldoende zuur om een irreversibele additie van het proton aan het mesomeer ion te veroorzaken. De ontleding van het enolaat wordt echter uitgevoerd met een oplossing van ammoniumchloride in water. Het NH_4Cl dient om de tijdens de reactie vrijkomende KOH te binden.
Door te hoge H^+ of OH^- ionenconcentratie in de oplossing isomeriseert het Δ 5 cholestenon zeer snel tot Δ 4 cholestenon.
In samenwerking met de heer K. de Jong chem. cand. hebben wij getracht volgens de methode van Birch Δ 5 cholestenon te bereiden. Wij hebben echter geen zuiver product in handen kunnen krijgen. Waarschijnlijk is de oorzaak hiervan gelegen in het feit, dat Δ 5 cholestenon zeer gemakkelijk isomeriseert tot Δ 4 cholestenon.

PAR. 4 DE SYNTHESE VAN VITAMINE D_3 $3C^{14}$

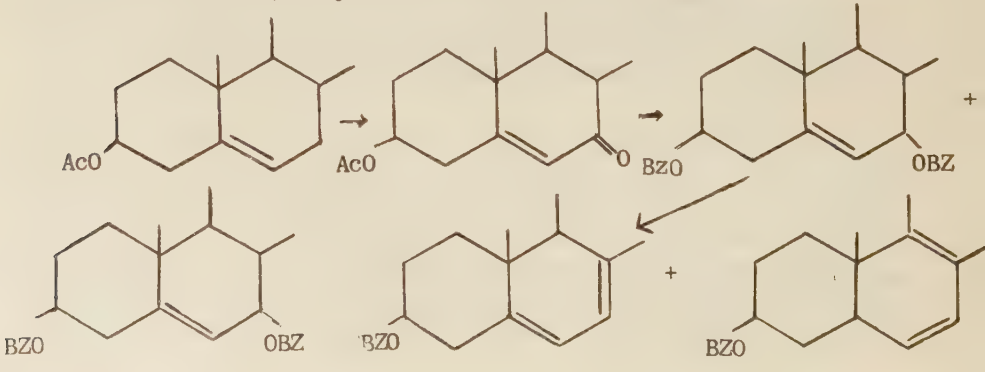
A Inleiding

Vitamine D_3 kan bereid worden uit 7 dehydrocholesterol door bestraling met ultraviolet licht, dus langs photochemische weg. Ook met behulp van α, β of γ stralen, röntgenstralen, of hoogfrequente wisselstromen kan uit provitamene D vitamine D gevormd worden. De bestraling met ultravioletlicht is echter het beste onderzocht en wordt hoofdzakelijk toegepast. Op beperkte schaal wordt ook electronenbestraling gebruikt, doch hierbij ontstaan onzuivere producten.

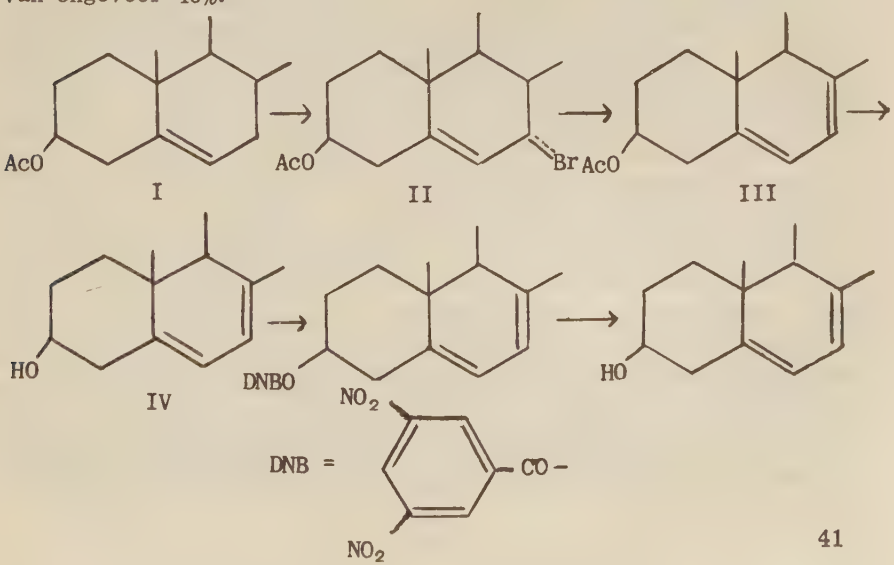
Volgens de in par. 1 en 2 aangegeven methode hebben wij 300 mg cholesterylacetaat 3 C^{14} bereid. Wanneer wij deze kleine hoeveelheid in vitamine D_3 3 C^{14} willen omzetten, moeten de volgende processen worden uitgevoerd: de synthese van voldoende zuiver 7 dehydrocholesterol 3 C^{14}, de bestraling van dit provitamine met ultravioletlicht en de isolering van vitamine D_3 3 C^{14} uit het bestralingsproduct. Het feit, dat wij op deze zichzelf bekende reacties op semi-microschaal moesten uitvoeren, bracht bijzondere problemen met zich mee.

a De synthese van 7 dehydrocholesterol

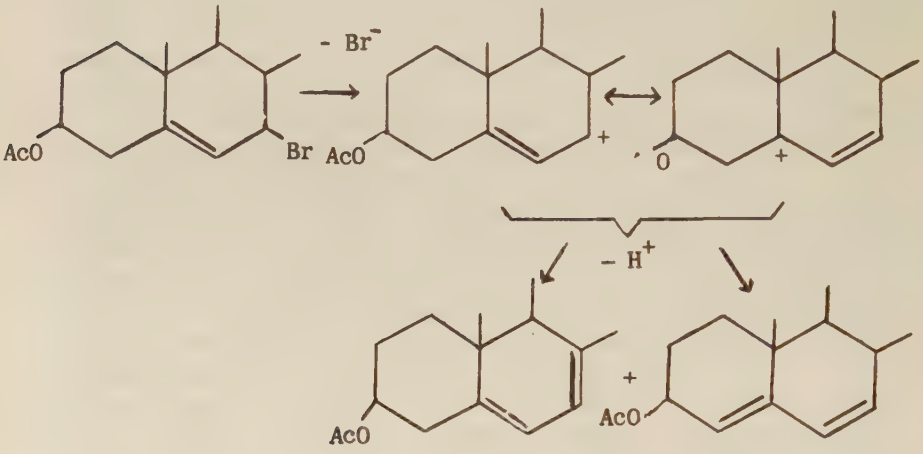
7 Dehydrocholesterol kan volgend de methode van Windaus, Lettré en Schenck[35] bereid worden uit cholesterol in een opbrengst van ongeveer 8%. Hierbij wordt uitgegaan van cholesterylacetaat, dat met chroomzuur geoxydeerd wordt tot 7 oxcholesterol. Uit deze verbinding ontstaat door reductie volgens Meerwein Ponndorf met aluminiumisopropylaat, gevolgd door benzoylering, een mengsel van 80% 7β hydroxycholesteryldibenzoaat en 20% 7α hydroxycholesteryldibenzoaat. De β verbinding gaat door pyrolyse over in benzoezuur en een mengsel van 7 dehydrocholesterylbenzoaat en isodehydrocholesterylbenzoaat. Via het 3,5 dinitrobenzoaat is hieruit zuiver 7 dehydrocholesterol te bereiden.



Aanvankelijk vond de synthese van Windaus door de slechte opbrengst geen technische toepassing en moest in behoefte aan vitamine D_3 worden voorzien door gebruik van levertraan of van praeparaten, die door bestraling van uit avertebraten (o.a. mossel) geisoleerde provitaminen waren verkregen [36]. Later zijn echter vele verbeteringen aangebracht, waardoor de synthese van Windaus, ondanks de vele tussenproducten toch voor de bereiding van vitamine D_3 langs technische weg gebruikt kon worden. Deze verbeteringen zijn o.a. vervangen van de pyrolyse door refluxen met dimethylaniline, reductie met $LiAlH_4$ in plaats van met aluminium-isopropylaat, verbeterde oxydatie met CrO_3, enz.
In 1947 publiceerden Keverling Buisman, Stevens en van der Vliet[37] een nieuwe methode voor de synthetische bereiding van provitamine D_3. Deze publicatie werd later door vele andere gevolgd. Bij de nieuwe synthese wordt evenals bij de synthese van Windaus gebruik gemaakt van de reactiviteit van de waterstofatomen aan C7 van cholesterylacetaat. Volgens Ziegler e.m. [38] kan een waterstofatoom aan het naast een dubbele band gelegen koolstofatoom vervangen worden door broom met N-broomsuccinimide. Ziegler deelt in zijn publicatie mede, dat N-broomsuccinimide snel reageert met cholesterolesters, maar geeft verder geen details over het verloop van de reactie. De Nederlandse onderzoekers zijn er nu in geslaagd door bromering van cholesterylacetaat I met broomsuccinimide, gevolgd door debromering van het ruwe 7 broomcholesterylacetaat II met dimethylaniline of collidine 7 dehydrocholesterol IV te bereiden in een opbrengst van ongeveer 40%.



De laatste twee trappen dienen voor de zuivering van het preparaat. Als bijproduct ontstaat o.a. Δ 4-6 cholestadienol V. Een mogelijk reactieschema voor de vorming van 7 dehydrocholesterol en Δ 4-6 cholestadienol wordt door Bide, Henbest, Jones, Peevers en Wilkinson[39] opgegeven.

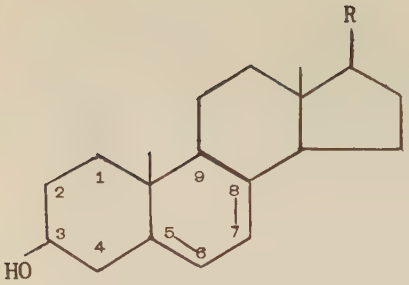


Volgens Schaltegger en Müllner[40] ontstaat bij de bromering van cholesterylacetaat met broomsuccinimide primair het 7 α broom cholesterylacetaat. Door epimerisatie gaat deze verbinding in polaire oplosmiddelen over in een overwichtsmengsel, dat voor 70% uit 7 β broomcholesterylacetaat en 30% uit de α verbinding bestaat. Aangezien de oplosbaarheid van 7α broomcholesteryl - acetaat in verschillende oplosmiddelen veel groter is dan van de 7 β verbinding, wordt bij kristallisatie steeds het 7β broom cholesterylacetaat verkregen.

Bij de bereiding van 7 dehydrocholesterol wordt het intermediaire 7 broomcholesterylacetaat in het algemeen niet geisoleerd en het ruwe bromeringsproduct direct met s-collidine gedebromeerd[37]. Het 7 dehydrocholesterylacetaat kan eveneens het beste zonder verdere zuivering worden verzeept. Het aldus verkregen 7 dehydrocholesterol bevat als voornaamste verontreinigingen cholesterol en Δ 4,6 cholestadienol. Door verestering van het ruwe product met 3,5 dinitrobenzoylchloride in pyridine ontstaat een dinitrobenzoaat, dat zich door omkristallisatie uit

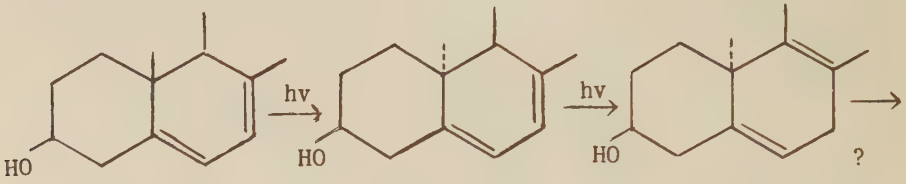
benzol-aceton laat zuiveren[41]. Het dinitrobenzoaat van Δ 4,6 cholestadienol lost nl. in aceton veel beter op dan het 7 dehydrocholesteroldinitrobenzoaat. Door verzeping van deze laatste verbinding kan een praeparaat verkregen worden, dat voor ongeveer 90% uit 7 dehydrocholesterol bestaat en vrijwel geen Δ 4,6 cholestadienol meer bevat.De voornaamste onzuiverheid is cholesterol. Deze laatste verbinding werkt echter niet storend bij de bestraling en kan tegelijk met onomgezet 7 dehydrocholesterol door behandeling met digitonine uit het bestralingsproduct worden verwijderd.
Het gehalte aan 7 dehydrocholesterol en Δ 4,6 cholestadienol van de op de hierboven beschreven wijze bereide praeparaten kan met behulp van het U.V. absorptiespectrum bepaald worden. 7 Dehydrocholesterol heeft absorptiemaxima bij 271, 282 en 293 mμ. In dit gebied absorbeert Δ 4,6 cholestadienol vrijwel niet. Deze verbinding heeft een absorptiemaximum bij 239 mμ. De absorptie van 7 dehydrocholesterol is bij deze golflengte klein, hoewel niet te verwaarlozen. Cholesterol werkt niet storend bij de bepaling.

b De bestraling van 7 dehydrocholesterol met ultraviolet licht
De kennis, die wij op het ogenblik hebben van de bestraling van provitaminen D met ultraviolet licht, is voor het grootste deel ontleend aan onderzoekingen over de bestraling van ergosterol Dit provitamine D_2 was veel eerder bekend dan het provitamine D_3 of 7 dehydrocholesterol. Ergosterol en 7 dehydrocholesterol verschillen alleen in de bouw van de zijketen. Het provitamine D_2 heeft een Δ 22-23 dubbele band en een methylproep aan C 24 . Door bestraling van 7 dehydrocholesterol ontstaan producten, die volkomen te vergelijken zijn met de bestralingsproducten van ergosterol. Voor de bestraling van ergosterol pleegt menhet op blz. 44 volgende schema op te schrijven.
Dit schema is omstreeks 1932 door Windaus opgesteld echter zonder het praecalciferol. Deze verbinding is in 1949 ontdekt door Velluz, Amiard en Petit[42]. Wij komen hierop later nog terug.
In het schema op pag. 44 is het vitamine D_2 in de cis-vorm weergegeven. Dit is waarschijnlijk onjuist. Door Crowfoot en Dunitz[43] is in 1948 door röntgenanalyse aangetoond, dat het 4-jood- nitrobenzoaat van calciferol in kristallijne toestand de transstructuur bezit (zie onderaan pag. 44).
Alle bestralingsproducten zijn isomeren van ergosterol, zij

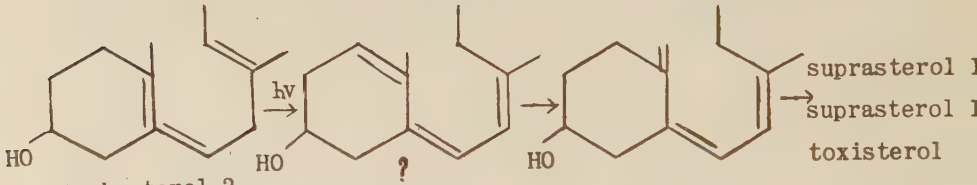


ergosterol

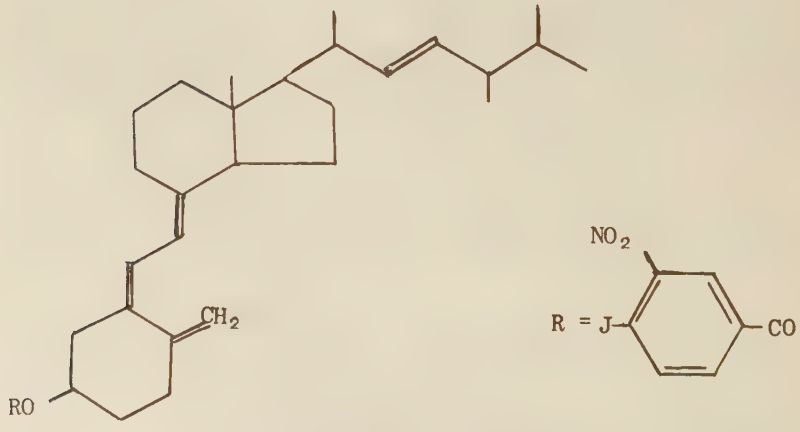
7 dehydro-
cholesterol



ergosterol lumisterol 2 protachysterol



tachysterol 2 praecalciferol vitamine D_2



transstructuur van vitamine D_2

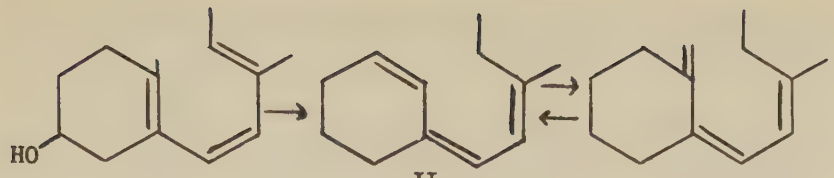
kunnen echter niet met digitonine worden neergeslagen. Lumisterol ontstaat uit het provitamine door epimerisatie van de methylgroep aan C 10. Bij tachysterol is ring B geopend door verbreking van de C_9 - C_{10} band. Hierbij ontstaat een nieuwe dubbele band. Van de zg. overbestralingsproducten suprasterol I, suprasterol II en toxisterol is de structuur onbekend. Voor de bestraling van 7 dehydrocholesterol geldt hetzelfde schema, alleen moet dan de index 2 door 3 worden vervangen en moeten we bedenken, dat de bouw van de zijketen anders is. Van alle bestralingsproducten zijn alleen het vitamine D en het praevitamine D antirachitisch actief. In 1929 gelukte het Reerink en van Wijk[44] door in achtnemen van bepaalde maatregelen bij de bestraling (gebruik van licht met golflengte > 280 mμ, volkomen afwezigheid van zuurstof, goede roering en omzetting van niet meer dan 50% van het gebruikte ergosterol) een kristallijn antirachitisch werkzaam product te verkrijgen, dat zij de *stof L* noemmdn. Deze stof had een biologische activiteit van 23.000 I.E. per mg. Twee jaar later werd ongeveer tegelijk door Engelse en Duitse onderzoekers [45,46] de isolering van zuiver kristallijn vitamine D_2 gepubliceerd.Dit had een antirachitische activiteit van 40.000 I.E. per mg. De stof L is waarschijnlijk een mengsel vam lumisterol, tachysterol en vitamine D_2. Bij bewaren van de stof L in vacuo nemen de specifieke draaiing en de absorptie van ultraviolet licht toe. Windaus en Auhagen[47], die dit verschijnsel ook hadden waargenomen, trachtten een verklaring te geven door aan te nemen, dat bij de bestraling protachysterol ontstaat, dat in een donkerreactie overgaat in tachysterol. Deze donkerreactie verloopt langzaam bij kamertemperatuur, doch veel sneller bij hogere temperatuur. Tijdens de omzetting wordt de specifieke draaiing positief en neemt de ultraviolette absorptie vooral bij 280 mμ toe. Dit zou volgens Windaus en Auhagen wijzen op het ontstaan van tachysterol, dat nl. een scherp absorptiemaximum heeft bij 280 mμ.
De volgende tabel moge een en ander verduidelijken:

Tabel III

	abs.max. in mμ	$E^{1\%}_{1\ cm}$
ergosterol	271, 282, 293	284, 302, 172
lumisterol 2	271.5, 280	248, 232
tachysterol 2	280	578
praevitamine D_2	265	274
vitamine D_2	265	474
toxisterol 2	248	
suprasterol 2 I	< 240	
suprasterol 2 II	< 240	

Door de hypothese van Windaus wordt echter nog niet de waarneming van Reerink e.m. verklaard, dat de vers bereide stof L een ultraviolette absorptie heeft, die lager is dan uit het, langs biologische weg bepaalde, gehalte aan vitamine D te berekenen is. Een mogelijke verklaring van dit verschijnsel werd in 1949 gegeven door Velluz, Amiard en Petit[42]. Deze onderzoekers hebben aangetoond, dat bij de bestraling primair het zg. praevitamine D gevormd wordt. Dit gaat in opgeloste toestand, zonder dat hiervoor bestraling nodig is, bij kamertemperatuur langzaam en bij hogere kamertemperatuur sneller over in vitamine D.
Omgekeerd gaat vitamine D in oplossing gedeeltelijk over in praevitamine. Er stelt zich een evenwicht in, dat voor ongeveer 15% - 20% aan de kant van het praevitamine ligt. Door alle bewerkingen uit te voeren bij een kamertemperatuur beneden 10^{o} C hebben Velluz e.m. zowel praecalciferol als praevitamine D_3 in de vorm van de 3,5 dinitrobenzoezure ester in kristallijne toestand uit de respectievelijke bestralingsproducten kunnen isoleren. De praevitaminen zelf zijn nog niet in kristallijne toestand verkregen. Praevitamine D heeft evenals vitamine D een absorptiemaximum bij 265 mμ, doch de extinctie bedraagt slechts ongeveer de helft. De antirachitische werking is hetzelfde als van vitamine D. De praevitaminen draaien minder naar rechts dan de overeenkomstige vitaminen. De toename van de specifieke rotatie en van de ultraviolette absorptie van de stof L of van het bestralingsproduct kan uitstekend verklaard worden door de omzetting van praevitamine in vitamine. Aangezien praecalciferol en calciferol biologisch dezelfde activiteit bezitten, is het thans te begrijpen, dat met behulp van het U.V. spectrum een lager gehalte aan vitamine D gevonden werd dan met de biologische bepaling. Door de ontdekking van het praevitamine wordt de aanname van protachysterol misschien overbodig. De door Windaus en Auhagen waargenomen absorptietoename bij 280 mμ blijft echter nog onverklaard.
Velluz e.m. geven twee hypothesen voor de structuur van het praevitamine. Het is mogelijk, dat praevitamine en vitamine cis-trans isomeren zijn, waarbij dan aan het vitamine D volgens Crowfoot en Dunitz[43] de transstructuur toekomt. Een andere mogelijkheid wordt door het reactieschema op blz. 47 weergegeven. Het lijkt niet onmogelijk, dat uit het tachysterol I primair het praevitamine met de structuur II gevormd wordt.

Het door Windaus opgestelde schema voor het ontstaan van de



I II III

verschillende bestralingsproducten is volgens van der Vliet [48] zeer onwaarschijnlijk. Door Haman en Steenbock[49] en door Harris, Bunker en Mosher[50] is nl. het aantal lichtquanten, bepaald, dat nodig is voor de bereiding van 1 molecuul vitamine D_2 uit ergosterol. Bij een zeer korte bestralingsduur, waarbij niet meer dan ongeveer 1/10.000 van het aanwezige provitamine wordt omgezet, is de quantenopbrengst 0.3 - 0,5, zodat er dus gemiddeld op de 2 à 3 geabsorbeerde quanten 1 molecule vitamine D ontstaat. Wanneer wij nu met Windaus aannemen, dat lumisterol en tachysterol noodzakelijke tussenproducten zijn bij de bereiding van vitamine D, dan is deze quantenopbrengst niet goed te begrijpen. Immers slechts een zeer kleine fractie ($\sim 10^{-4}$) der geabsorbeerde qaunten wordt door lumisterol opgevangen. De kans dat een tachysterol molecule een quant zou absorberen is nog veel kleiner. De hoge quantenopbrengst zou men bijv. kunnen verklaren door aan te nemen, dat uit een door een quant geactiveerd provitamine-molecuul hetzij een molecuul lumisterol, hetzij tachysterol, hetzij vitamine D kan ontstaan. Deze bestralingsproducten kunnen door absorptie van een lichtquant wederom worden aangeslagen, waarbij de verder in de bestralingsreeks gelegen stoffen ontstaan. De samenstelling van het bestralingsproduct is sterk afhankelijk van de gebruikte golflengte. Bij bestraling met langgolvig ultraviolet licht (λ>284 Mμ) ontstaat naast vitamine D voornamelijk lumisterol, terwijl met kortgolvig (λ<284 mμ) licht weinig lumisterol en veel tachysterol gevormd wordt. De hoeveelheid vitamine D, die ontstaat, is in beide gevallen ongeveer gelijk. Bij bestraling met licht van zeer korte golflengte (λ<254 Mμ) ontstaat echter meer tachysterol tegen minder vitamine D_2, terwijl bestraling met zeer langgolvig licht (λ>290 mμ) bijv. zonlicht eveneens de opbrengst aan vitamine ongunstig beinvloedt[51].

Voor de bestraling van kleine hoeveelheden provitamine hebben wij een apparaat ontworpen, waarin, om plaatselijke overbestraling

te voorkomen, de 7-dehydrocholesteroloplossing langs de bestralingslamp wordt gepompt.

c De isolering van vitamine D_3 uit het bestralingsproduct.
Om de vorming van overbestralingsproducten te vermijden wordt het provitamine D_3 slechts bestraald, totdat zich ongeveer 50% heeft omgezet. Het onomgezette materiaal kan door precipitatie met digitonine of kristallisatie worden teruggewonnen. Het provitaminevrije bestralingsproduct bestaat voor ongeveer 50% uit praevitamine D_3 en vitamine D_3 en verder uit lumisterol, tachysterol en overbestralingsproducten. De isolering van vitamine D_3 uit dit ingewikkelde mengsel is geen eenvoudige zaak. Bij bereidingen op grotere schaal, kan kristallijn vitamine D_3 worden verkregen door een ingewikkelde zuivering via de 3,5 dinitrobenzoezure ester[52]. Deze methode is echter ongeschikt voor toepassing op semi-micro schaal. In de patentliteratuur[53] wordt verder een methode aangegeven voor de zuivering van vitamine D_3 via de dubbelverbinding met cholesterol. Bij de uitvoering op semi-microschaal bleek de opbrengst echter onvoldoende te zijn. Wij hebben nu op de volgende wijze uit het bestralingsproduct een vitamine D_3 praeparaat bereid, dat een zeer goed ultraviolet absorptiespectrum vertoonde en voor ongeveer 75 - 80% uit vitamine D_3 bestond. Het bestralingsproduct werd door behandeling met maleinezuuranhydride tachysterolvrij gemaakt. Hierna werd het mengsel met 3,5 dinitrobenzoylchloride veresterd en gechromatografeerd. Deze laatste methode en ook de pogingen tot isolering van de vitamine D_3-cholesterol dubbelverbinding zullen onder B uitvoerig besproken worden.

B Resultaten van eigen onderzoek

a De synthese van 7 dehydrocholesterol 3 C^{14}
Wij hadden de beschikking over 296 mg cholesterylacetaat 3 C^{14} met een activiteit van 5400 ± 50 tikken /min., na verbranding gemeten als $BaCO_3$ in een oneindig dikke laag. In twee porties van ongeveer 150 mg hebben wij op de onder A beschreven wijze 120 mg van een praeparaat bereid, dat 90% 7 dehydrocholesterol 3 C^{14} bevatte. Er was nog 0,7% Δ4,6 cholestadienol 3 C^{14} aanwezig. Het U.V. absorptiespectrum wordt door fig. 1 weergegeven.

De voornaamste verontreining is cholesterol 3 C^{14}, doch deze verbinding stoort niet bij de bestraling en kan na de bestraling tegelijk met onomgezet 7-dehydrocholesterol worden verwijderd.

b De bestraling van provitamine D_3 3 C^{14} met ultraviolet licht

De meest effectieve bestraling vindt plaats bij een golflengte van 281 mμ (absorptiemaximum van 7 dehydrocholesterol). Zoals echter reeds op blz. 47 werd vermeld, is de hoeveelheid vitamine, die gevormd wordt door bestraling met licht met golflengten tussen de 254 en 290 mμ weinig afhankelijk van de golflengte. De hoeveelheden tachysterol en lumisterol, die gevormd worden, zijn echter wel van de golflengte afhankelijk. Wij hebben gebruik gemaakt van het door een 250 Watt kwiklamp (biosol A) uitgezonden licht. Dit werd gefiltreerd door een 0,4% oplossing van $NaNO_3$ in water[54]. Door deze oplossing worden de schadelijke stralen met $\lambda < 250$ mμ tegengehouden en vooral licht met λ tussen de 255 en 285 mμ doorgelaten. Door deze wijze van bestralen wordt naast vitamine D vooral tachysterol gevormd. Dit kan echter, in tegenstelling met lumisterol en overbestralingsproducten, door behandeling met maleinezuuranhydride in de vorm van een additie product gemakkelijk uit het bestralingsmengsel worden verwijderd. Om de vorming van overbestralingsproducten (toxisterol en suprasterolen) te vermijden, wordt het provitamine D_3 bestraald, totdat zich ongeveer 45% heeft omgezet. Het onomgezette 7 dehydrocholesterol en het als verontreiniging aanwezige cholesterol kan met digitonine worden neergeslagen. De overmaat digitonine laat zich door wassen met water volledig uit het filtraat verwijderen. De bestralingstijd hebben wij van tevoren vastgesteld door een aantal charges inactief 7 dehydrocholesterol verschillende tijden te bestralen en door precipitatie met digitonine de hoeveelheden onomgezet provitamine te bepalen.
Op een wijze, die in hoofdstuk III nader besproken zal worden, hebben wij in op de hierboven beschreven wijze verkregen inactief bestralingsproduct de gehalten aan vitaminen D en tachysterol bepaald en hiervoor resp. ongeveer 47 en 25% gevonden.
Om de bestraling van provitamine op semi-micro schaal te kunnen uitvoeren, hebben wij een klein apparaat ontworpen, waarin de oplossing van provitamine in aether door een kwartsvat wordt gepompt, dat concentrisch om de bestralingslamp is aangebracht. Aangezien de bestralingsproducten zeer gevoelig zijn voor zuurstof, werd voor de bestraling de lucht in het apparaat zorgvuldig door stikstof vervangen. Voor de verdere details verwijzen wij naar het experimentele gedeelte van dit hoofdstuk. Door het onder a verkregen provitaminepreaparaat gedurende 7,5 min. te bestralen in 140 ml aether werd 44,5% van het 7 dehydrocholesterol 3 C^{14} omgezet. Na de scheiding met digitonine

bleef 47,5 mg bestralingsproduct achter. Op grond van de met inactief materiaal verkregen resultaten mogen wij aannemen, dat dit bestralingsproduct ongeveer 45 - 50% vitamine D_3C^{14} bevatte.

c De isolering van vitamine D_3 3 C^{14} uit het bestralingsproduct

1 Pogingen tot isolering van de vitamine D_3-cholesterol dubbelverbinding op semi micro schaal

Volgens de in de patentliteratuur[53] opgegeven voorschriften wordt door verzeping van de p. nitrobenzoezure of van de 3,5 dinitrobenzoezure ester verkregen vitamine opgelost in aceton, tesamen met ongeveer de gelijke hoeveelheid cholesterol. Na toevoeging van water, totdat juist een troebeling ontstaat, kristalliseert de dubbelverbinding in fijne naaldjes uit. Ook uit het ruwe bestralingsproduct is het mogelijk op ongeveer dezelfde wijze vitamine D_3-cholesterol dubbelverbinding te isoleren. Uitgaande van ongeveer 50 mg provitaminevrij bestralingsproduct hebben wij getracht op semimicro schaal de dubbelverbinding te bereiden. De resultaten waren echter niet schitterend. Slechts ongeveer 32% van het vitamine bleek in het geisoleerde product aanwezig te zijn. De kristallisatie werd uitgevoerd in aceton. Bij gebruik van aceton-water was de opbrengst nog lager. Wij hebben overmaat cholesterol toegevoegd (45%), aangezien bij proeven op grotere schaal hierdoor goede resultaten waren verkregen. Hoewel door het aanbrengen van wijzigingen in het voorschrift (kleinere overmaat cholesterol, minder aceton) de opbrengst waarschijnlijk nog wel te verbeteren is, lijkt het toch niet waarschijnlijk, dat op deze kleine schaal meer dan 50% van het aanwezige vitamine kan worden geisoleerd in de vorm van de dubbelverbinding. Wij zijn daarom overgegaan tot de volgende methode.

2 Isolering van vitamine D uit het bestralingsproduct met behulp van methoden, die in de analytische chemie gebruikt worden bij de vitamine D bepaling.

Zoals in hoofdstuk III uitvoerig besproken zal worden, wordt bij de quantitatieve bepaling van vitamine D gebruik gemaakt van de kleurreactie van vitamine D met een oplossing van $SbCl_3$ in $CHCl_3$, waaraan wat acetylchloride is toegevoegd (Nields reagens). Tachysterol geeft echter deze kleuring ook, zodat deze verbinding eerst moet worden verwijderd. Dit kan geschieden door verhitting op 75° met maleïnezuuranhydride in benzeenoplossing. Het hierdoor gevormde additieproduct kleurt niet met $SbCl_3$. Vitamine D reageert echter ook met maleïnezuuranhydride, hoewel ongeveer

met 10 x kleinere snelheid. De hierdoor optredende vitamine-verliezen kunnen bij de bepaling door extrapolatie in rekening worden gebracht.
Wij hebben nu op de volgende wijze uit bestralingsproduct een praeparaat bereid, dat voor ongeveer 75 - 80% uit vitamine D_3 bestond en waarvan het ultraviolet-absorptie spectrum vrijwel vrijwel identiek was met dat van kristallijn vitamine D_3.
Door verhitting met maleinezuuranhydride in benzeen werd het tachysterol omgezet in een additieproduct, dat door middel van chromatografie of door verzepen kan worden verwijderd. Bij de verzeping ontstaat nl. een maleinezuurderivaat dat bij aether-extractie in de alkalische waterlaag achterblijft. Bij de behandeling met maleinezuuranhydride gaat ongeveer 8 - 10% van het vitamine verloren. (Zie hoofdstuk III blz.96). Het tachysterolvrije bestralingsproduct bevat nu nog als voornaamste onzuiverheden lumisterol en overbestralingsproducten. De scheiding van vitamine D en lumisterol levert vele moeilijkheden op. Lumisterol 2 is te verkrijgen uit vitamine D 1 (een molecuulverbinding van lumisterol 2 en vitamine D 2) door middel van kristallisatie van het acetaat[55]. Een dergelijke kristallisatie zou echter, indien zij al gelukte, onder onze omstandigheden tot te grote verliezen aanleiding geven. Een andere mogelijkheid is de chromatografie. Bij de vitamine D bepaling wordt bij de aanwezigheid van storende stoffen zoals oxydatieproducten of andere verontreinigingen, die met $SbCl_3$ een kleurreactie geven, vaak chromatografie over Al_2O_3 toegepast. Het vitamine D laat zich goed elueren met petroleumaether + 40% aether of met petroleumaether + 1% aethanol. Bij gebruik van dit laatste elueermiddel kan de vitamine D band zichtbaar gemaakt worden met sudan III. Deze kleurstof wordt tegelijk met het vitamine uit de Al_2O_3 kolom geelueerd. Wij hebben nu lumisterol 2 met sudan III gechromatografeerd en het bleek, dat ongeveer 90% van het lumisterol 2 tegelijk met het sudan III de kolom verliet. Op deze wijze zal dus lumisterol 2 (en dus waarschijnlijk ook lumisterol 3) niet van vitamine D_3 gescheiden kunnen worden.
Aangezien bij de bereiding van kristallijn vitamine D_3 gebruik gemaakt wordt van de kristallisatie van het 3,5 dinitrobenzoaat, leek het niet onmogelijk door chromatografie van gedinitrobenzoyleerd bestralingsproduct een zuiver product te verkrijgen. Hiertoe hebben wij het tachysterolvrije bestralingsproduct met 3,5 dinitrobenzoylchloride in pyridine veresterd en de verkregen

dinitrobenzoaten opgenomen in petroleumaether + 8% aether. Hierbij bleef een kristallijn residu achter. Aanvankelijk werd vermoed, dat dit misschien lumisteroldinitrobenzoaat was, doch bij onderzoek van het U.V. absorptiespectrum van het verzeepte product (stof y) bleek, dat een absorptiemaximum bij 235 mμ aanwezig was, terwijl lumisterol bij 265 en 280 mμ absorptiemaxima heeft (zie fig.2, pag.118). Met $SbCl_3$ gaf de stof y ongeveer dezelfde kleurreactie als vitamine D. Om te onderzoeken, of de stof y misschien nog vitamine D als verontreiniging bevatte, hebben wij chromatografie met sudan III toegepast. De rode band werd met petroleumaether + 1% alcohol geëlueerd. In het U.V. absorptiespectrum van deze fractie was echter weinig van vitamine D te bespeuren. Er was een maximum bij 255 m (fig.3, pag.118). Met hetzelfde elueermiddel werd, nadat de rode band de kolom verlaten had, nog een kleine hoeveelheid van dezelfde stof verkregen. De oplossing van de dinitrobenzoaten in petroleumaether + 8% aether, die na afscheiding van het onbekende kristallijne product was achter gebleven werd nu gechromatografeerd over Al_2O_3. Boven in de kolom bleef een geel gekleurde band over. Het vitamine D_3 dinitrobenzoaat werd met petroleumaether + 8% aether geelueerd. Na verzeping van het dinitrobenzoaat werd een vitamine D_3 praeparaat verkregen dat met alcohol-water zelfs een begin van kristallisatie vertoonde.

Wij hebben het U.V. absorptiespectrum van ons praeparaat (fig.4, pag.118) vergeleken met dat van kristallijn vitamine D_3 op een wijze, die door Oser, Melnick en Pader[56] is aangegeven. Deze auteurs wijzen erop, dat niet alleen de ligging en de hoogte van de absorptiemaxima van belang zijn bij de bepaling van de zuiverheid van een praeparaat, maar ook de gehele vorm van de absorptiecurve. De absorptiespectra van verschillende praeparaten kunnen nu, ook bij verschillende concentraties, goed vergeleken worden door i.p.v. de extinctie de extinctie gedeeld door de extinctie van het abs. maximum uit te zetten tegen de golflengte. Oser e.m. hebben dit toegepast bij de bepaling van de zuiverheid van vitamine A praeparaten. In fig.5, pag.119, hebben wij op dezelfde wijze een door chromatografie van het dinitrobenzoaat gezuiverd vitamine D_3 praeparaat vergeleken met kristallijn vitamine D_3. De zuiverheid van ons praeparaat lijkt zeer goed. Wij moeten echter de nauwkeurigheid van de vergelijkingsmethode van Oser zeker niet overschatten en niet uit het oog verliezen, dat van de aanwezigheid van 10 – 20% lumisterol in het spectrum niet veel te merken is. In fig. 5, pag.119, hebben wij daarom ook nog uitgezet het

verhoudingsspectrum van een mengsel bestaande uit 80% kristallijn vitamine D_3 en 20% lumisterol 2. Aangezien lumisterol absorptie maxima vertoont bij 265 en 280 m zal dus vooral tussen deze golflengten het absorptiespectrum van vitamine D door de aanwezigheid van lumisterol beinvloed worden. Fig. 5, pag. 119, doet vermoeden, dat waarschijnlijk niet meer dan 10% lumisterol in ons praeparaat aanwezig was. Aangezien het gewicht ongeveer 20 - 25% meer bedroeg dan op grond van de aanwezige hoeveelheid vitamine D_3 te verwachten was, moeten behalve lumisterol ook nog andere onzuiverheden (overbestralingsproducten) aanwezig geweest zijn.
Daar de hoeveelheid tachysterol in het bestralingsproduct ongeveer 25% bedroeg en bij een hoog tachysterolgehalte het lumisterolgehalte meestal laag is, lijkt het niet waarschijnlijk, dat er meer dan 10% lumisterol in het bestralingsproduct aanwezig was. Door de chromatografie van de dinitrobenzoaten zou dus misschien geen scheiding tussen lumisterol en vitamine D zijn verkregen. Toch heeft de wijze van zuivering zeker zin gehad, omdat allerlei onzuiverheden, die steeds in kleine hoeveelheden bij chemische reacties ontstaan, hierdoor zijn verwijderd. Ware dit niet het geval, dan zou het ultraviolet absorptiespectrum (fig. 5. pag. 119) zeker een ongunstiger beeld vertonen.
Om na te gaan, in welke mate bij de isolering van vitamine D uit het bestralingsproduct verliezen optreden, hebben wij bij een van de voorproeven met inactief materiaal steeds na iedere bewerking (maleinezuuranhydride behandeling, chromatografie, enz.) de intensiteit van de kleurreactie met Nield's reagens bepaald. Op blz. 93 van hoofdstuk III worden deze metingen besproken. Als voornaamste resultaat willen wij hier vermelden, dat bij de chromatografie van het vitamine D_3-dinitrobenzoaat geen verliezen aan vitamine optreden.

Uit 47,5 mg actief bestralingsproduct, verkregen door de bestraling van 7 dehydrocholesterol 3 C^{14}, hebben wij op de hierboven beschreven wijze een praeparaat bereid, dat 17,4 mg zuiver vitamine D_3 3 C^{14} bevatte. Het U.V. absorptiespectrum is in fig. 6, pag. 118, weergegeven. In fig. 7, pag. 119 , wordt het spectrum vergeleken met dat van kristallijn vitamine D_3. Wij hebben ongeveer 75% van het in het bestralingsproduct aanwezig vitamine geisoleerd.
Op grond van voorproeven met inactief materiaal moet de hoeveelheid vitamine D_3 3 C^{14} ongeveer 75 - 80% bedragen van het

totale gewicht van het praeparaat.Dit werd bevestigd door meting van de radioactiviteit. Deze bleek 25% hoger te zijn dan op grond van de aanwezige hoeveelheid vitamine D_3 3 C^{14} te verwachten was. Het praeparaat bevatte dus blijkbaar nog ongeveer 25% andere radioactieve producten (lumisterol, overbestralings-producten).
Het vitamine D_3 3 C^{14} hebben wij opgelost in arachisolie en deze oplossing gebruikt voor de dierproeven, die in Hoofdstuk IV besproken worden.

PAR. 5 EXPERIMENTEEL GEDEELTE

CH_3MgJ oplossing (Gilman[57])

Bepaling van de CH_3MgJ concentratie (Gilman[58])

10 ml van de CH_3MgJ oplossing werd met een injectiespuit in een 200 ml erlenmeyer gebracht en 25 ml gedestilleerd water toegevoegd. De gevormde Mg-hydroxyden werden in oplossing gebracht door toevoeging van grote overmaat (ongeveer 50 ml) 0,20 n H_2SO_4 en verwarmen op een kookplaat op 60° C. De heldere oplossing werd teruggetitreerd met 0,2 n NaOH met methyloranje als indicator. Deze titrimetrische methode heeft het nadeel, dat eventuele ontledingsproducten van CH_3MhJ, die in de te stellen oplossing aanwezig zijn, ook door het H_2SO_4 worden getitreerd. Er wordt dan een te hoog gehalte aan CH_3MgJ gevonden. Het is dus van groot belang de oplossing te bereiden en te bewaren onder stikstof.

$CH_3C^{14}OONa$ (van Bruggen[16])

Wij hadden de beschikking over 191 mg Oak Ridge $BaC^{14}O_3$ met een activiteit van 3 mC en hebben hieruit in drie porties van ongeveer 60 mg gemerkt Na-acetaat bereid.

Een platina schuitje van de vorm M[1]) werd gewogen in een weegflesje, voorzien van een ebonieten bodem, waarin een uitholling was gemaakt. In de zuurkast werd nu 50 tot 100 mg $BaCO_3$ (0,25 tot 0.50 mmol) op het schuitje gebracht en het weegflesje weer gewogen. Nadat de verbindingsbuis D met anhydron was gevuld, werd het schuitje met een pincet in C gebracht en het apparaat in elkaar gezet. Hierbij werd gebruik gemaakt van minimale hoeveelheden siliconenvet. De reservoirs A en G werden voorzien van goed sluitende rubberkapjes en de kranen F en B geopend. Door middel van een injectienaald nr 20, verbonden met een pomp, werd het rubberkapje van reservoir G doorboord en het apparaat tot op 15 mm Hg geëvacueerd. Hierna werden de kranen gesloten en het vacuum gecontroleerd. Met een injectiespuit werd 1 ml 40% perchloorzuuroplossing in A gebracht en viervoudige overmaat, gebaseerd op de hoeveelheid $BaCO_3$, CH_3MgJ oplossing in G. Dit is ongeveer 3 tot 4 ml van een 0,5 n oplossing. Het inbrengen en weer uittrekken van de injectienaalden gaat vrijwel zonder vacuumverlies, vooral wanneer de rubberkapjes met een kleine hoeveelheid glycerine zijn ingesmeerd. De injectiespuit, die

1) Zie fig. 8 op pag. 119.

voor de CH_3MgJ oplossing werd gebruikt, werd van te voren met CO_2-vrije droge stikstof doorstroomd.
Een derde van de bodem van E werd nu gekoeld in vloeibare lucht. Door een zeer voorzichtige manipulatie van de kraan B werd een kleine hoeveelheid perchloorzuur in C gebracht. De CO_2 ontwikkeling moet langzaam gaan. Het apparaat was van tevoren goed ontvet, opdat zich geen grote druppels in de buis K vormen. Nadat er vast CO_2 op de bodem van E was verschenen, werd door een snelle beweging van de kraan F een hoeveelheid CH_3MgJ oplossing toegelaten. Er ontstond een snelle vervluchtiging, onmiddellijk gevolgd door een weer bevriezen van beide reagentia. De cyclus van CO_2 bevrijding en toevoeging van de Grignard oplossing werd herhaald, totdat zich geen CO_2 meer ontwikkelde. De gehele reactie was in 2 tot 4 minuten beëindigd. De vloeibare lucht werd nu verwijderd en vervangen door een ijswaterbad. Door het ontdooien van de inhoud van E trad een goede menging op. Na ongeveer 5 minuten werd E weer in vloeibare lucht geplaatst en een kleine hoeveelheid CO_2-vrije N_2 door middel van een naald in het kapje op A in het systeem gebracht. Hierdoor werd eventueel nog niet omgezet CO_2 naar E gedreven. De onderdruk bleef echter behouden, hetgeen te zien was aan de naar binnen gezogen rubberkapjes. De inhoud van E werd nu wederom ontdooid in ijswater en met een injectiespuit 3 tot 4 ml CO_2-vrij water in G gebracht. Om het water van G in E te brengen was een positieve N_2 druk nodig, die gemakkelijk werd aangelegd met een naald door het kapje van G. Op dezelfde manier werd 0,5 ml 6 n H_2SO_4 toegevoegd. Het systeem werd nu met stikstof doorstroomd in de richting van A naar G. De naald in G was verbonden met een wasflesje met CO_2-vrije NaOH om eventueel onomgezet CO_2 op te vangen. Tijdens dit proces werd de kolf E omgeven met water van 30° C, zodat tegelijkertijd de aether werd verdreven. Deze condenseerde voornamelijk in G, waaruit ze later met een pipet gemakkelijk kon worden verwijderd.
Nadat alle aether uit E was verdreven, werd de verbinding met D verbroken, de punt van het gasinleidbuisje met 2 ml H_2O afgespoeld en 0,5 – 0,8 g Ag_2SO_4 toegevoegd om het aanwezige jodide te binden. Een klein kooksteentje van 10 – 15 mg voorkwam stoten tijdens de destillatie. De kolf E werd nu verbonden met een destillatieopstelling, zoals getekend in fig. 9, pag. 119, en verhit op een zandbad.
Tijdens de destillatie werd G gevuld gehouden met water. Nadat de oplossing in E tot een klein volume was ingedampt, werd

ongeveer 20 ml water toegevoegd van G uit in drie porties. Het azijnzuur werd continu getitreerd vanuit een microburet, met ongeveer 0,2 n NaOH. Als indicator werd phenolphtaleine gebruikt en tijdens de titratie werd magnetisch geroerd. Steeds werd vermeden, dat de kolf E droogkookte met het oog op ontleding van het AgJ.

De CO_2-vrije NaOH werd als volgt bereid: 5 g zuiver natrium werd opgelost in 80 ml alcohol, die op een waterbad tot koken was verhit. De rondbodem werd steeds met een horlogeglas afgedekt gehouden. De ontwijkende waterstof en alcoholdamp beletten het binnentreden van CO_2. De laatste resten Na werden voorzichtig in oplossing gebracht met kleine hoeveelheden uitgekookt water. Hierna werd de alcohol met een stroom CO_2-vrije lucht op een kokend waterbad verdreven, totdat geen alcohollucht meer werd waargenomen. Het residu werd opgelost in water en aangevuld tot 1 liter. Stellen op oxaalzuur gaf een titer van 0,2274 n.

Resultaten

Van Bruggen en medewerkers verkregen na 5 0 synthesen te hebben uitgevoerd, waarbij aan het apparaat steeds kleine verbeteringen werden aangebracht, reproduceerbare opbrengsten van 80 - 90%. In de volgende tabel geven wij de door ons behaalde resultaten weer:

Tabel IV

$BaCO_3$	Aantal ml CH MgJ opl.	Aantal ml NaOH 0,2274 n	Opbrengst	Opmerkingen
0,1002 g	3,5 ml 0,61 n	1,580 ml	70,7%	niet ver genoeg doorgetitreerd
0,1024 g	5 ml 0,61 n	1,811 ml	79,4%	
0,1046 g	4,5 ml 0,61 n	1,981 ml	85 %	
$BaC^{14}O_3$				
0,0652 g	3,5 ml 0,53 n	1,016 ml	70 %	
0,0679 g	3,5 ml 0,53 n	1,086 ml	71,8%	klein verlies aan $BaCO_3$ tijdens het overbrengen
0,0574 g	3,5 ml 0,53 n	0,87 ml	68 %	

Wij kunnen zeggen, dat met inactief $BaCO_3$ onze resultaten niet veel minder zijn. Met $BaC^{14}O_3$ werden iets lagere opbrengsten verkregen. Van Bruggen en medewerkers hebben eenzelfde ervaring opgedaan. Toen zij de synthese voor het eerst met actief $BaCO_3$ uitvoerden, haalden zij 68% opbrengst en een tweede maal 73%, terwijl in 4 daaraan voorafgaande bereidingen met inactief materiaal 72,8; 95; 90,4 en 88,4% opbrengst was verkregen. Als oorzaak van deze daling in het rendement geven zij op het optreden van verliezen bij het overbrengen van het $BaCO_3$ van het weegflesje uit in het reactievat. Door lading, veroorzaakt door wrijving van rubber-handschoenen, maar vooral ook door de eigenlading van de deeltjes[59], zijn, naar men zegt, deze geneigd om bij het inbrengen van het schuitje aan het slijpstuk van het reactievat te blijven kleven. Wij hebben van deze verschijnselen echter weinig gemerkt. Wel bleek het actieve $BaCO_3$ sterk geneigd tot opstuiven bij de toevoeging van de eerste druppels perchloorzuur. Ondanks het feit, dat wij het apparaat steeds goed ontvet hebben, zodat het perchloorzuur in kleine hoeveelheden langs de wand kon worden toegevoegd, was opstuiven van het actieve $BaCO_3$ niet geheel te vermijden. Waarschijnlijk is dit de oorzaak van de lagere opbrengsten bij het werken met actief materiaal. Verder kan de opbrengst nog ongunstig beinvloed zijn door het feit, dat bij de actieve synthese met het oog op het risico met kleinere hoeveelheden $BaCO_3$ werd gewerkt (65 mg tegen 100 mg bij de inactieve synthese). Het $BaCO_3$ van Oak Ridge bleek een iets groter soortelijk volume te hebben dan het door ons gebruikte inactieve $BaCO_3$. Het eerste is waarschijnlijk op andere wijze gepraecipiteerd.

Phenylacetaat $CH_3C(=O)^{14}-OC_6H_5$ (Turner[8])

Het phenylacetaat werd bereid volgens de door Turner aangegeven methode. Natriumacetaat werd met thionylchloride omgezet in acetylchloride en deze verbinding veresterd met phenol. Het reactiemengsel werd hierna in aether opgenomen en met verdunde NaOH gewassen om de overmaat phenol te verwijderen. Na afdestilleren van de aether werd het ruwe product gefractionneerd. Bij de eerste bereidingen konden wij aanvankelijk geen hogere opbrengst verkrijgen dan 50%, terwijl Turner 91% opgeeft. Door het aanbrengen van kleine verbeteringen, zoals het watervrij maken van het natriumacetaat door drogen in hoogvacuum bij 100° C in plaats van door smelten en vervanging van de 80% overmaat thionylchloride door 20%. kon de opbrengst tot 59% worden

opgevoerd. De gefractionneerde destillatie werd zo efficient mogelijk uitgevoerd in het in fig. 10, pag. 120, getekende apparaat. Een hoogvacuummantel om de Widmerspiraal zorgt voor een efficiente fractionnering. De buis binnen de spiraal dient tevens als capillair. Bij destillatie van zuiver phenylacetaat kon 94% teruggewonnen worden. Door Hoeflake[60] was geconstateerd, dat phenylacetaat door wassen met verdunde loog enigszins verzeept. Volgens Hoeflake kan de phenol het beste verwijderd worden door eenmaal te wassen met 5% KOH en eenmaal met 2% KOH. Wij hebben 3.3 g phenylacetaat op de door Hoeflake aangegeven wijze gewassen. en het bleek nu, dat 30% van het phenylacetaat was verzeept. Door zo snel mogelijk met weinig ijskoude 5% NaOH te wassen, hebben wij de opbrengst tot 77,4% kunnen opvoeren.

Uitvoering van de synthese met gemerkt materiaal

Aan de waterige oplossing van gemerkt natriumacetaat werd 3.96 g $CH_3COONa\ 3\ H_2O$ toegevoegd en de oplossing bij gewone druk drooggedampt. Tijdens het indampen werd de oplossing alkalisch gehouden. Nadat de laatste sporen water in hoogvacuum (10^{-5} mm) en bij 100° C waren verwijderd, werd het natriumacetaat met 9 ml droge benzeen bedekt. Aan de in ijs gekoelde oplossing werd langzaam een oplossing van 4,3 g $SOCL_2$ in 4,3 ml droge benzeen toegevoegd. Na 10 min. werd het ijsbad verwijderd en het mengsel nog 1½ uur bij kamertemperatuur bewaard, waarna 4,3 g vers gedestilleerde phenol werd toegevoegd en 4½ uur aan een terug vloeikoeler gekookt. Na afkoelen werd water toegevoegd en het mengsel tweemaal met aether geextraheerd. De aetherische oplossing (ongeveer 200 ml) werd nu tweemaal zo snel mogelijk met 50 ml ijskoude 5% NaOH en daarna met gedestilleerd water gewassen. Na drogen boven Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd en het residu gefractionneerd. Met een kleine hoeveelheid van een siliconenpraeparaat kon schuimen tijdens de destillatie worden voorkomen. Het phenylacetaat ging nu over bij 75 - 76° C en 10 mm druk. Toen de destillatie beëindigd was, werd nog 0.9 g inactief phenylacetaat in de kolf gebracht en hiermede door destillatie de laatste resten actief materiaal uit het apparaat gespoeld. In totaal werd 4,036 g verkregen (77,4%).

Δ 4 Cholestenon

Als uitgangsmateriaal voor de synthese van cholestenon 3 C^{14} hebben wij cholestenon gebruikt, dat bereid was volgens de in Organic Syntheses[61] aangegeven methode.

5 Oxo 3,5 seco A norcholestaan 3 carbonzuur (Turner[9])
22 g cholestenon (smp 79 - 80°) werd opgelost in een mengsel van 330 ml aethylacetaat en 330 ml ijsazijn. De oplossing werd gekoeld op -10° en twee mol. aequivalenten O_3 ingeleid. Hierna werd 50 ml H_2O en 5 ml 30% H_2O_2 toegevoegd. Nadat het mengsel 18 uur bij kamertemperatuur had gestaan, werd met 1 liter aether verdund en de oplossing goed met water gewassen. Door de aetherische oplossing vijf maal te schudden met verdunde NaOH (ongeveer 2%, bij gebruik van sterkere loog ontstonden moeilijk oplosbare emulsies van het Na-zout van het ketozuur) werd het ketozuur geextraheerd. De verzamelde extracten werden aangezuurd met verdund HCl en het gepraecipiteerde product werd opgenomen in aether. De aetherische oplossing werd gewassen met water en verzadigde NaCl oplossing en gedroogd boven Na_2SO_4. Na indampen tot klein volume werd ongeveer 150 ml petroleumaether kp 50 - 80° toegevoegd. Er ontstonden 12,8 g kristallen smp 151 - 152,5°. Indampen van de moederloog gaf nog 0,65 g ketozuur smp 147,5 - 151°.
De neutrale aetherische oplossing, die na de extractie met NaOH was achtergebleven, werd gedroogd op Na_2SO_4 en ingedampt. Het residu werd opgelost in 165 ml ijsazijn en een oplossing van 2,2 g perjoodzuurdihydraat in 55 ml 80% azijnzuur toegevoegd. Na twee uur staan bij kamertemperatuur werd met 500 ml aether verdund en de aetherische oplossing gewassen met ongeveer 1½ liter gedestilleerd water. Hierna werd het ketozuur met 2% NaOH geextraheerd. De verzamelde alkalische extracten werden met verdunde HCl aangezuurd en het neerslag in aether opgenomen. De aetherische oplossing werd gewassen met water en verzadigde NaCl oplossing en gedroogd op Na_2SO_4. Na indampen tot klein volume werd ongeveer gelijk volume petroleumaether toegevoegd. Er ontstonden 1,7 g kristallen smp 147 - 150°. waaruit door omkristallisatie uit aether-petroleumaether nog een portie zuiver ketozuur kon worden verkregen.

5 oxo 3,5 seco A nor 5 cholesteen 3 carbonzuur lacton (Turner[9])
10 g ketozuur werd 46½ uur met 125 ml, na toevoeging van natriumacetaat, gedestilleerd azijnzuuranhydride en 50 ml vers gedestilleerd acetylchloride. Hierna werden azijnzuuranhydride en acetylchloride in vacuum afgedestilleerd. Het residu werd in aether opgenomen en de aetherische oplossing gewassen met verdunde Na_2CO_3 oplossing, H_2O en verzadigde NaCl oplossing. Na drogen boven Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd. Het residu

werd in kokende aceton opgelost en een paar druppels water toegevoegd. Er ontstonden mooie kristalnaalden. Opbrengst 4 g, smp 93 – 94°.
Uit de moederloog kon door verschillende kristallisaties nog 2 9 g met smp 92,5 – 93,5° en 0,45 g smp 93,5 – 94,5° gewonnen worden.

Δ 4 Cholestenon 3 C^{14} *(Turner*[9] *)*

5,77 g enol lacton en 4,036 g gemerkt phenylacetaat werden opgelost in 25 ml droge benzeen. De lucht in de kolf werd door N_2 verdrongen en 1,14 g onder stikstof gewogen NaH (opm. 1) toegevoegd. Hierna werd 46 uur magnetisch geroerd en door middel van een gasburet de ontwikkelde waterstof gemeten. Overdag werd de temperatuur van het reactievat op 20° C gehouden. Na 46 uur ontwikkelde zich geen waterstof meer na aanzuren met verdund HCl werd het reactieproduct in aether opgenomen. De aetherische oplossing werd gewassen met water, gedroogd op Na_2SO_4 en ingedampt. De laatste resten vluchtige producten, zoals phenol werden verwijderd bij 100° en 0,01 mm. Het olieachtige residu werd nu 27 uur met 200 ml azijnzuur en 25 ml geconcentreerde HCl in een stikstofatmospheer gerefluxt. Na afkoeling van het reactiemengsel werd met water verdund en verschillende malen met aether geextraheerd. De gecombineerde aetherextracten werden met H_2O en met 3% NaOH gewassen gedroogd op Na_2SO_4 en drooggedampt. Het residu werd opgelost in 200 ml petroleumaether (k.p. 60–80°) en gechromatografeerd (opm. 2) over 60 g Al_2O_3. Met petroleum aether liet zich een onbekende stof elueren, die bij ongeveer 250° smolt. Dit product hebben wij niet nader onderzocht. Met petroleumaetherbenzeen mengsels van resp. 9 1, 7 3 en 1 1 werd 2,56 g cholestenon 3 C^{14}, smp 78 – 79°, geelueerd. Aangezien in de eerste fracties behalve het kristallijne product met smp 250° ook nog wat olie aanwezig was, hebben wij deze nogmaals gechromatografeerd en hierdoor nog 0,69 g cholestenon 3 C^{14} met smp 78 – 80° verkregen. Totale opbrengst dus 3,25 g. Bij de voorproeven met inactief materiaal hebben wij op dehierboven beschreven wijze verkregen cholestenon omgekristalliseerd uit aceton methanol en van het zuivere product smeltpunt en draaiing bepaald:
smp 80 – 81° $[\alpha]_D^{24^\circ}$ = + 93,1 (α = 30,5°; c = 0,546 g/100 ml $CHCl_3$
Het smeltpunt van de op gewone wijze door oxydatie volgens Oppenauer uit cholesterol bereid cholestenon is 79 – 80° (Org. Syntheses[61]). Ons product was dus zeer zuiver, hetgeen ook

blijkt uit de door Barton en Jones[62] opgegeven specifieke draaiing van een door chromatografie gezuiverd praeparaat.

$[\alpha]_D^{20^o}$ = + 92,2 (c = 4,51 g/100 ml $CHCl_3$)
= + 93,6 (c = 3,095 g/100 ml $CHCl_3$)

Van het radioactieve materiaal hebben wij met het oog op het risico de specifieke draaiing niet bepaald.

Aangezien het smeltpunt van het chromatografisch gezuiverde actieve product tamelijk goed was, hebben wij dit niet meer door omkristalliseren gezuiverd. Achteraf is gebleken, dat toch nog een onzuiverheid, waarschijnlijk de bij ongeveer 250° smeltende stof, aanwezig was. Hierdoor is de opbrengst in de volgende trappen ongunstig beinvloed.

De activiteit van ons product was, gemeten in een oneindig dikke laag $BaCO_3$, 5315 ± 150 tikken per min.

De opbrengst was ongeveer gelijk aan de door Turner behaalde, nl. 51% berekend op enol-lacton.

Opmerking 1

Wij hebben aanvankelijk moeilijkheden gehad met het verkrijgen van het voor estercondensatie nodige NaH. Bij pogingen om deze verbinding te bereiden door H_2 te leiden over op 400° C verhit Na werd een zeer geringe opbrengst verkregen, omdat het natrium vrijwel niet reageerde. Volgens Hansley en Carlisle[63] is deze moeilijkheid op te heffen door toevoeging van sporen van natriumderivaten van anthraceen, phenanthreen of fluoreen. Verhitting op 250 – 300° is dan reeds voldoende en de opbrengst aan NaH wordt quantitatief. Helaas geven de auteurs geen uitgewerkte voorschriften en verwijzen slechts naar patentliteratuur.

De N.V. Noury en van de Lande was zo vriendelijk ons een kleine hoeveelheid NaH te schenken. Wij betuigen haar hiervoor onze hartelijke dank.

Opmerking 2

Bij de verschillende chromatografische zuiveringen in dit proefschrift werd steeds gewerkt volgens aanwijzingen van Reichstein en Shoppee[64]. De Al_2O_3 kolom werd gemaakt door het aluminiumoxyde in een fijne stroom in een met petroleumaether gevulde buis te suspenderen. Nadat alle Al_2O_3 was toegevoegd, werd de petroleumaether afgetapt. Hierbij werd vermeden, dat de kolom kwam droog te staan. Het filtraat werd nog verschillende malen door de buis gegoten, totdat het Al_2O_3 niet meer samenpakte.

Zacht tikken tegen de buis bespoedigde de vorming van een goede kolom.

Cholestenonenolacetaat (Westphal[18])

10 g cholestenon werd in een stikstofatmospheer gedurende 1½ uur verhit op 95 - 105° met 12,5 ml vers gedestilleerd acetylchloride en 12,5 ml vers gedestilleerd azijnzuuranhydride. Na indampen in vacuum werd het residu opgenomen in zo weinig mogelijk chloroform en uitgegoten in 160 ml alcohol. Door te verwarmen op een waterbad ging alles in oplossing. Bij afkoeling ontstonden 9,69 g kristallen, smp. 77,6°.

$[\alpha]_D^{18^\circ} = -98^\circ 12'$ ($\alpha = -2^\circ 24'$; c = 2.44 g/100 ml $CHCl_3$)

Westphal geeft op voor zeer zuiver cholestenonenolacetaat smp. 81° $[\alpha]_D^{23^\circ} = -100,4^\circ$ ($\alpha = -1,27^\circ$; c = 1,265 g/100 ml $CHCl_3$)

Volgens Reich en Lardon bevat de moederloog van de eerste kristallisatie nog niet omgezet cholestenon. Er werd nu gepoogd dit nogmaals te acetyleren. De moederloog werd daartoe droog gedampt en het residu in aether opgenomen. Na wassen van de aetherische oplossing met water tot neutrale reactie en drogen op Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd. Het residu werd 1 uur verhit met 1,5 ml acetylchloride en 1,5 ml azijnzuuranhydride op 95 - 105° in een stikstofatmospheer. Na afdestilleren van AcCl en Ac_2O werd de achterblijvende olie in $CHCl_3$ opgenomen en uitgegoten in 24 ml alcohol. Na de oplossing iets te hebben ingedampt, ontstonden kristallen, die na twee maal omkristalliseren uit $CHCl_3$-alcohol en uit aceton-methanol, waarbij met noriet werd gekookt, 0,29 g cholestenonenolacetaat leverden.

Smp. 77,5°; $[\alpha]_D^{17^\circ} = +97^\circ 5'$ ($\alpha = -1^\circ 36'$; c = 1,65 g/100 ml $CHCl_3$)

Totale opbrengst 90,2%

Cholestenonenolacetaat 3 C^{14}

3,24 g cholestenon 3 C^{14} werd op de hierboven beschreven wijze geacetyleerd. Het eerste kristallisaat was echter nog niet voldoende zuiver en werd daarom nogmaals uit $CHCl_3$-alcohol omgekristalliseerd, waarbij met noriet werd gekookt. De opbrengst was 2,2 g (61,3%), smp. 80 - 81°.

$[\alpha]_D^{20^\circ} = -99,5$ ($\alpha = -42'$; c = 0,706 g/100 ml $CHCl_3$)

De lagere opbrengst bij de bereiding van het gemerkte enolacetaat is te wijten aan een onzuiverheid in het volgens Turner bereide cholestenon. Dit hebben wij slechts door chromatografie gezuiverd, aangezien het smeltpunt goed was en omkristalliseren vrij grote verliezen geeft.

Door middel van een tweede acetylering, gevolgd door chromatografie, hebben wij getracht uit de moederlogen nog wat zuiver cholestenonenolacetaat te winnen. De meeste fracties leverden echter slechts olieachtige of te laag smeltende producten. Het zou niet onmogelijk zijn, dat het Al_2O_3 het enolacetaat enigszins verzeept.
Om het actieve materiaal niet verloren te laten gaan, hebben wij alle fracties met onzuiver enolacetaat weer verzeept op een wijze, die door Westphal[18] voor testosteronacetaat is aangegeven. De verzamelde fracties werden gedurende 1 uur gerefluxt met 100 ml alcohol, 23 ml benzeen en 80 ml 5n H_2SO_4. Het cholestenon werd met water neergeslagen en in aether opgenomen door de suspensie tweemaal met aether te extraheren.
De aetherische oplossing werd gewassen met water, 2 n NaOH en water, Na drogen op Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd en het residu opgelost in 50 ml petroleumaether (kp. 60 – 80°) en gechromatografeerd over 20 g Al_2O_3. Elueren met 250 ml petroleumaether en 100 ml petroleumaether-benzeen 9:1 leverde 186 mg cholestenon. Omkristalliseren uit aceton-methanol gaf 158 mg cholestenon 3 C^{14}, smp. 76 – 78°. Het product begon reeds te sinteren bij 70° en was dus blijkbaar nog niet geheel zuiver.
Activiteitsmetingen
Cholestenonenolacetaat 5458 ± 100 tikken/min.
Cholestenon (onzuiver) 6404 ± 120 tikken/min.
Beide activiteiten zijn gemeten in een oneindig dikke laag $BaCO_3$.

6 Broomcholestenon 3 C^{14}
a N-broomaceetamide (Manguin[65])
Volgens Manguin bereid N-broomaceetamide is volgens Winstein en Henderson[66] een mengsel van $CH_3CONHBr$ en $CH_3CONHBr.H_2O$ en bevat volgens genoemde auteurs ongeveer 70% monohydraat.

b 6 Broomcholestenon 3 C^{14} (Reich en Lardon[3])
2,16 g cholestenonenolacetaat 3 C^{14} werd in twee porties omgezet in 6-broomcholestenon 3 C^{14}. Voor de eerste hoeveelheid hebben wij het volgende voorschrift gebruikt:
Een suspensie van 0,9366 g cholestenonenolacetaat 3 C^{14} en 600 mg N-broomaceetamide in een mengsel van 40 ml zuivere aceton en 6 ml H_2O werd gedurende 1 uur magnetisch geroerd. Na 16½ uur staan bij kamertemperatuur werden de steroiden neergeslagen met water en afgezogen. De kristallen werden met water en verdunde aceton gewassen. Opbrengst: 0,9728 g Smp. 129 – 130°.

De tweede portie werd op analoge wijze omgezet.
Totale opbrengst 2,2294 g (94,7%).
Bij de voorproeven met inactief materiaal, die op geheel analoge wijze werden uitgevoerd, werd 89,7% opbrengst verkregen.

c 6 Broomcholestenon (Inhoffen[19])
2 g cholestenon en 3 g broomsuccinimide[67]) werden in 150 ml CCl_4 gedurende 5 uur in het donker gerefluxt. Hierna werd de overmaat broomsuccinimide en het succinimide afgefiltreerd en de oplossing in vacuum ingedampt. Naast olieachtige producten kristalliseerde onzuiver 6-broomcholestenon uit. Na omkristallisatie uit aceton-methanol was het smeltpunt 117 - 122°. Zuiver 6-broomcholestenon smelt bij 131 - 132°.
Inhoffen geeft een opbrengst op van 40 - 60%. Aangezien door bromering van cholestenonenolacetaat met N-broomaceetamide ongeveer 80% opbrengst wordt verkregen (berekend op cholestenon), hebben wij de methode van Inhoffen niet verder onderzocht.

Cholestaandion (3,6) 3 C^{14} (Dane[20])
2,2294 g 6-Broomcholestenon 3 C^{14} werden opgelost in 81,5 ml methanol. Bij deze oplossing werd gevoegd 0,66 ml sterk HCl. Na 3 uur refluxen werd het cholestaandion 3,6 neergeslagen met H_2O en afgezogen. Het in een exsiccator gedroogde product werd opgelost in 66 ml kokende alcohol. Bij afkoeling ontstonden 1,358 g mooie naalden met smp. 170°. Uit de moederloog konden nog twee fracties gewonnen worden, die na omkristalliseren uit alcohol nog 0,1656 mg van een bij 169 - 170° smeltend product leverden. Totale opbrengst was 1,5236 g cholestaandion (3,6) 3 C^{14} (79%).
Bij de voorproeven met inactief materiaal was op dezelfde wijze 76,1% opbrengst verkregen.

Cholestaandiol 3,6 diacetaat (Reich en Lardon[3])
2,5 g cholestaandion (3,6) werden met 200 mg PtO_2 in 60 ml, door refluxen met $KMnO_4$ en destillatie gezuiverd azijnzuur, gehydrogeneerd. Gedurende 1½ uur werd precies de berekende hoeveelheid waterstof opgenomen. Het Pt werd afgefiltreerd en de ijsazijn in vacuum afgedestilleerd. Het residu werd opgenomen in aether en de aetherische oplossing gewassen met water en op Na_2SO_4 gedroogd. Na afdestilleren van de aether werd het residu 2 uur verhit op een waterbad met 10 ml pyridine en 8 ml azijn-zuuranhydride. Pyridine en azijnzuuranhydride werden in vacuum

afgedestilleerd en het residu in aether opgenomen. Na wassen met 4 n HCl, verdunde Na_2CO_3 oplossing en water werd de oplossing boven Na_2SO_4 gedroogd. De aether werd afgedestilleerd en het ruwe product uit alcohol omgekristalliseerd. Opbrengst 2,55 g, smp. 137 - 138°.
$[\alpha]_D^{19°} = -21° 44'$ (c = 6,97 g/100 ml $CHCl_3$)
Door indampen van de moederloog werd nog 0,21 g, smp. 124 - 129° verkregen. Deze fractie leverde na twee maal omkristalliseren nog 100 mg diacetaat, smp. 135 - 136°.
De verzamelde moederlogen werden vervolgens drooggedampt, het residu opgenomen in 100 ml petroleumaether en over 45 g Al_2O_3 gechromatografeerd. Met petroleumaether liet zich een stof elueren, die uit alcohol in mooie naalden kristalliseerde. Volgens Reich en Lardon is dit cholestanol (6) acetaat.
Elueren met petroleumaether-benzeen (9:1) gaf na omkristalliseren uit alcohol, 10 mg cholestaandiol (3,6) diacetaat, smp. 134 - 135°.
De totale opbrengst bedroeg 2,66 g (87,2%).

Cholestaandiol (3,6) diacetaat 3 C^{14}

Op dezelfde wijze als bij de voorproeven met inactief materiaal werd 1,5236 g cholestaandion (3,6) 3 C^{14} met 0,123 g PtO_2 in 37 ml gezuiverd azijnzuur gehydrogeneerd. Na enige uren werd geen waterstof meer opgenomen. Toch waren nog onopgeloste kristallen aanwezig. Vermoedelijk was de katalysator vergiftigd. Het onopgeloste materiaal en het platina werden daarom afgefiltreerd en het filter overgoten met een paar ml warm azijnzuur, waardoor de kristallen oplosten. De oplossing werd nu nogmaals gehydrogeneerd met behulp van 50 mg PtO_2. Er werd nog 49 ml H_2 opgenomen. In totaal is opgenomen 194 ml H_2. Voor de reductie van 172 mg PtO_2 is nodig 38 ml H_2. Door ons praeparaat is opgenomen 157 ml H_2, terwijl voor de reductie van 1,52 g cholestaandion (3,6) 186 ml nodig is. Er is dus blijkbaar een verontreiniging aanwezig geweest, want bij de verschillende hydrogeneringen van inactief materiaal werd steeds de berekende hoeveelheid H_2 opgenomen. Waarschijnlijk speelde hier nog dezelfde onzuiverheid, die reeds in het cholestenon aanwezig was, een rol. Dit bijproduct verlaagt klaarblijkelijk het smeltpunt weinig en heeft ook weinig invloed op de draaiing. Het cholestenonenolacetaat smolt immers bij de goede temperatuur en vertoonde ook de juiste specifieke draaiing. Ook de smeltpunten van de volgende tussenproducten waren goed.

Het gehydrogeneerde product werd op de reeds hierboven beschreven wijze opgewerkt. Door kristallisatie uit alcohol werd 1,0184 g met smp. 128 - 130° verkregen. Het smeltpunt moet volgens Reich en Lardon minstens 134 - 135° zijn. Omkristalliseren uit alcohol gaf 0,92 g, smp. 130 - 132°. Wij hebben het praeparaat nu door middel van chromatograferen over Al_2O_3, gevolgd door kristalliseren uit alcohol, gezuiverd. Uiteindelijk werd 739 mg cholestaandiol (3,6) 3 C^{14} van goede kwaliteit (smp. 134 - 136°) verkregen. Opbrengst 40%.
Als elueermiddel werd petroleumaether - benzeen 9:1 gebruikt. Met petroleumaether - benzeen 7:3 konden wij nog een kleine hoeveelheid van een bij 106 - 108° smeltende stof elueren, die volgens Reich en Lardon cholestaandiol (3β, 6α) diacetaat is. Het bij 135 - 136° smeltende isomeer is de 3β, 6β verbinding.

Cholestaandiol 3,6 - 3 C^{14} (Reich en Lardon[3])
739 mg cholestaandiol 3β,6β diacetaat 3 C^{14} werd 2 uurgerefluxed met 10 ml 10% oplossing van KOH in methanol. De methanol werd in vacuum verwijderd en het residu opgenomen in aether. De aetherische oplossing werd gewassen met H_2O en gedroogd op Na_2SO_4. De aether werd nu gedeeltelijk afgedestilleerd. Er ontstonden mooie kristalnaalden, smp. 194 - 194,5°. Opbrengst 0,3288 g. Het smeltpunt komt overeen met de hoogste waarde, die in de literatuur wordt opgegeven. Ons product was dus waarschijnlijk zeer zuiver. Reich en Lardon geven op smp. 190 - 191°. De moederloog leverde nog 0,1352 mg, smp. 193 - 194°. De resterende moederloog werd nu drooggedampt en het residu nogmaals 2 uur gerefluxed met 3 ml 10% oplossing van KOH in methanol. Opwerken en omkristalliseren op de hierboven beschreven wijze leverde nog 66 mg cholestaandiol met smp. 193,5 - 194°; totale opbrengst 530 mg (86,6%).
Bij voorproeven met inactief materiaal werd op dezelfde wijze 88,5% opbrengst verkregen. De specifieke draaiing van het inactieve materiaal bedroeg
$[\alpha]_D^{20^\circ} = +11^\circ$ ($\alpha = 13^1$; c = 1,98 g (100 ml $CHCl_3$))

Cholestaandiol 3,6 dimesylaat 3 C^{14} (Reich en Lardon[3])
0,53 g cholestaandiol 3,6 - 3 C^{14} werd opgelost in 5,5 ml pyridine en bij de op 0° gekoelde oplossing 0,66 ml mesylchloride (Johnson en Douglas[68]) gevoegd. Na een nacht staan bij 0° werd een stukje ijs toegevoegd en het praeparaat nog 2 uur op 0° gehouden. Hierna werd met water verdund en de steroiden in aether opgenomen.

De oplossing in aether werd gewassen met verdund HCl, verdunde Na_2CO_3 oplossing en tenslotte water en gedroogd op Na_2SO_4. Nadat een gedeelte van de aether was afgedestilleerd, werd een gelijk volume petroleum-aether toegevoegd. Na enige uren ontstond een wit neerslag van cholestaandiol 3,6 dimesylaat - 3 C^{14}. Dit werd afgezogen. Uit de moederloog konden nog twee kristallisaten gewonnen worden met hetzelfde smeltpunt: 130 - 131°.
Totale opbrengst 651,8 mg (88,7%).
Bij de voorproeven met inactief materiaal was 89% opbrengst verkregen.

Cholesterylacetaat (Org. Synthesis[89]; Reinitzer[70])
Door omkristalliseren uit aether-alcohol werd een product met smp. 114 - 115° verkregen.
$[\alpha]_D^{18^\circ} = -46,4^\circ$ ($\alpha = 28'$; c = 1,0 g/100 ml $CHCl_3$)

Cholesterylacetaat uit cholestaandiol 3,6 dimesylaat (Reich en Lardon[3])
a met zilveracetaat
290 mg dimesylaat werd 30 min. gekookt met 290 mg zilveracetaat in 12 ml azijnzuur. Het azijnzuur werd in vacuum afgedestilleerd en het residu in aether opgenomen. De aetherische oplossing werd met water gewassen, op Na_2SO_4 gedroogd en de aether afgedestilleerd. Het residu werd met 0,3 ml azijnzuuranhydride en 0,3 ml pyridine 2 uur op 50 - 60° verwarmd. Hierna werd het reactiemengsel in water uitgegoten. De neergeslagen steroiden werden in aether opgenomen, gewassen met water, verdund HCl, verdunde Na_2CO_3 oplossing en water en gedroogd op Na_2SO_4. Na afdestilleren van de aether werd het residu uit alcohol omgekristalliseerd. Opbrengst 110 mg cholesterylacetaat, smp. 105°. Door nogmaals omkristalliseren uit alcohol werd het smp. tot 109 - 111° verhoogd. Tenslotte werd door kristallisatie uit aether-alcohol 20 mg cholesterylacetaat, smp. 113 - 114° verkregen, dat met op de gewone wijze bereid cholesterylacetaat (zie hierboven) geen smeltpuntsverlaging gaf.
De verzamelde moederlogen werden drooggedampt en het residu opgelost in 20 ml petroleumaether. Bij chromatografie over 6 g Al_2O_3 werd in de eerste fractie een stof geisoleerd, die na omkristalliseren uit alcohol bij 75 - 76° smolt. Verder elueren met petroleumaether leverde na omkristalliseren uit alcohol 54 mg cholesterylacetaat, smp. 113 - 114°. Totale opbrengst 74 mg (33%).
De lage opbrengst is waarschijnlijk te wijten aan het feit, dat wij

niet voldoende gelet hebben op de qualiteit van het zilveracetaat.

b met kaliumacetaat

500 mg dimesylaat werd tezamen met 2 g vers gesmolten K-acetaat 4 uur gekookt in 20 ml ijsazijn. De temperatuur van het oliebad werd zo laag mogelijk gehouden. Na afdestilleren van het azijnzuur in vacuo werd het residu met water behandeld, in aether opgenomen en gewassen met H_2O, verdunde Na_2CO_3 oplossing en H_2O. Na drogen op Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd met 0,5 ml pyridine en 0,5 ml azijnzuuranhydride op 50 - 60°. Het reactiemengsel werd in water uitgegoten, de steroiden in aether opgenomen en de aetherische oplossing gewassen met H_2O, verdund HCl, verdunde Na_2CO_3 oplossing en H_2O. Na drogen op Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd en het residu uit alcohol omgekristalliseerd. Opbrengst 195 mg cholesterylacetaat, smp. 112 - 114°.

$[\alpha]_D^{20°} = -46,1°$ ($\alpha = 27,6'$; c = 1,0 g/100 ml $CHCl_3$)

Analyse: gevonden % C = 81,02 % H = 10,96

berekend % C = 81,31 % H = 11,21

Bij onderzoek onder het smeltpuntmicroscoop is later gebleken, dat ons product bij 105° sinterde en dus nog niet geheel zuiver was. Het actieve praeparaat hebben we uit aether alcohol gekristalliseerd. Hierdoor werd een zuiver product verkregen, dat geen sintering vertoonde. De moederloog werd nu drooggedampt, het residu opgenomen in 20 ml petroleumaether en gechromatografeerd over 8 g Al_2O_3. Door elueren met 20 ml petroleumaether werd in de eerste fracties (van 10 ml), evenals bij de bereiding met Ag-acetaat, de onbekende stof geisoleerd, die na omkristalliseren uit alcohol bij 75 - 76° smolt. Door verder elueren met 110 ml petroleumaether werd na omkristalliseren uit alcohol nog 50 mg cholesterylacetaat, smp. 113 - 114° verkregen.

Totale opbrengst 245 mg (64,1%).

Cholesterylacetaat 3 C^{14} (Reich en Lardon[3])

651,8 mg cholestaandiol 3,6 dimesylaat - 3 C^{14} werden op de hierboven beschreven wijze omgezet in cholesterylacetaat - 3 C^{14}. Bij de eerste kristallisatie uit alcohol werd 293 mg cholesteryl acetaat - 3 C^{14}, smp. 110 - 112° verkregen. Bij 95° trad reeds sintering op. Zowel dit product als de resterende moederloog hebben wij gechromatografeerd. Door elueren met petroleumaether en omkristalliseren uit aether alcohol werd tenslotte 308 mg cholesterylacetaat 3 C^{14} verkregen, dat in mooie naalden gekristalliseerd was en bij 113 - 115° smolt. Met op de gewone wijze bereid cholesterylacetaat trad geen smeltpuntsverlaging op

Uit de moederloog werd nog 6 mg met smp. 111 – 114° verkregen. De activiteit was gemeten in een oneindig dikke laag $BaCO_3$ 5395 ± 110 tikken/min.

Cholestaandiol (3,6) monoacetaat (3) (Reich en Lardon[3])

400 mg cholestaandiol, smp. 190 – 191° werden opgelost in 4 ml pyridine. Na toevoeging van 2 ml azijnzuuranhydride kristalliseerde het diol grotendeels weer uit. Na 4 uur schudden was alles opgelost. Pyridine azijnzuuranhydride werden nu in vacuum afgedestilleerd. Het residu werd in aether opgenomen en de oplossing gewassen met verdund HCl, verdunde Na_2CO_3 oplossing en water. Na drogen boven Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd, het residu opgenomen in 60 ml petroleumaether – benzeen 4:1 en de ontstane oplossing gechromatografeerd over 15 g Al_2O_3. Met petroleumaether – benzeen 4:1 werd 205 mg cholestaandiol 3,6 diacetaat geëlueerd.

smp. 137 – 138°; $[\alpha]_D^{16^\circ} = -21^\circ 6'$ ($\alpha = -26'$ c = 2.05 g/100 ml)

Met hetzelfde elueermiddel en met petroleumaether benzeen 1:1 werd verder 165 mg van een bij 156 – 157° smeltende stof verkregen. Dit zou cholestaandiol (3,6) monoacetaat (3) moeten zijn. In de literatuur[3,7] vinden we echter voor het smeltpunt 141 – 142° en 142 – 143°. Voor de specifieke draaiing wordt $[\alpha]_D$ = – 6,2°; – 6,4° (c = 1,290; 0,863 $CHCl_3$) opgegeven. Wij hebben ons product uit methanol omgekristalliseerd. Hierbij steeg het smp. tot 158 – 159°. Voor de specifieke draaiing vonden wij:

$[\alpha]_D^{16^\circ} = -6.9$ ($\alpha = 15'$ c = 3,61 g/100 ml $CHCl_3$)

Deze is dus binnen de waarnemingsfouten in overeenstemming met de door Plattner[7] opgegeven waarde. Vermoedelijk hebben wij hier met een andere modificatie van het monoacetaat te doen. Bij een van de fracties van de chromatografische zuivering hebben wij een dubbel smeltpunt waargenomen, nl. bij 140° en bij 156 – 157°.

Analyse van het bij 158 – 159° smeltende product:

Gev. % C = 77,71 % H = 11,17

Ber. % C = 78,03 % H = 11,21

Het monoacetaat, smp. 156 – 157°, liet zich met $POCl_3$ en pyridine omzetten in cholesterylacetaat, wat met op de gewone wijze bereid cholesterylacetaat geen smeltpuntsverlaging gaf. Het feit, dat bij de partiele acetylering van cholestaandiol (3.6) naast het monoacetaat ook een aanzienlijke hoeveelheid diacetaat ontstaat, maakt deze methode voor ons doel, de bereiding van

cholesterylacetaat in zo hoog mogelijke opbrengst, minder geschikt. Bij de synthese met actief materiaal hebben wij daarom de dimesylaatmethode gebruikt.

Cholesterylacetaat uit cholestaandiol (3,6) monoacetaat (Reich en Lardon[3])

155 g cholestaandiolmonoacetaat (3), smp. 156 – 157° werd opgelost in 1,3 ml droge pyridine en 0,52 ml $POCL_3$ toegevoegd. Na 24 uur staan bij kamertemperatuur werd water toegevoegd en het reactiemengsel met aether geextraheerd. De aetherische oplossing werd gewassen met verdund HCl, verdunde Na_2CO_3 en H_2O. Na drogen op Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd en het residu omgekristalliseerd uit aether methanol. Opbrengst 120 mg cholesterylacetaat, smp. 112 – 114°. Met authentiek cholesterylacetaat trad geen smeltpuntsverlaging op. Specifieke draaiing:

$[\alpha]_D^{18^o} = -46,4$ ($\alpha = 18'$; c = 1,0 g/100 ml $CHCl_3$)

Voor op de gewone wijze bereid cholesterylacetaat vonden wij

$[\alpha]_D^{18^o} = -46,4$ ($\alpha = 18'$; c = 1,0 g/100 ml $CHCl_3$)

Cholesterol uit cholestenonenolacetaat (Dauben[4]) *)

Een oplossing van 2,5 g $LiAlH_4$ in 175 ml absolute aether werd gekoeld op – 15°. Onder roeren werd gedurende 35 min. een oplossing toegevoegd van 1 g cholestenonenolacetaat in 40 ml absolute aether. De temperatuur werd op – 15° gehouden. Hierna werd nog 5 uur geroerd. Van tijd tot tijd werd wat absolute aether toegevoegd, in totaal 200 ml, om de alcoholaten beter in suspensie te houden. Na 5 uur werd aangezuurd met 0,5 N H_2SO_4 tot zure reactie op Congorood de aetherlaag afgescheiden en de waterlaag nog twee maal met 100 ml aether geextraheerd. De verzamelde aetheroplossingen werden gewassen met water, $NaHCO_3$ oplossing en water en gedroogd op Na_2SO_4. Na afdestilleren van de aether werd het ruwe mengsel van epimeren opgelost in 140 ml alcohol. Door toevoeging van een warme oplossing van 2 g digitonine in 200 ml 95% alcohol sloeg 1,74 g digitonide neer. Na 6 uur extraheren met absolute aether in een Soxhlet apparaat nam het gewicht af tot 1,7 g. Het digitonide werd opgelost in 21 ml droge pyridine en het digitonine neergeslagen met 275 ml aether. Nadat het neerslag was afgecentrifugeerd, werd de oplossing gewassen met H_2O, verdund HCl, verdunde $NaHCO_3$

**/ In samenwerking met de heer H. Hulleman (chem. cand.)*

oplossing en water en gedroogd op Na_2SO_4. Hierna werd de aether afgedestilleerd en het residu 4 uur gerefluxed met 75 ml 96% alcohol, waaraan 0,2 ml sterk HCl was toegevoegd. De steroiden werden met water neergeslagen, opgenomen in aether; de oplossing werd gedroogd op Na_2SO_4 en de aether verdampt. Het residu werd gechromatografeerd over 12 g Al_2O_3. Met benzeen-petroleumaether 1:1 en benzeen liet zich cholesterol elueren, dat na omkristalliseren uit methanol smolt bij 146 - 148°. Opbrengst was ongeveer 60 mg.
$[\alpha]_D^{24^o}$ = - 41,5 (α = - 51'; c = 2,07 g/100 ml $CHCl_3$)
Dauben geeft op een smp. van 146 - 148°; $[\alpha]_D^{24^o}$ = - 39,9° en een opbrengst van 34%, d.w.z. 308 mg, berekend op onze hoeveelheden. Wij hebben getracht de opbrengst te verbeteren door de reactietijd te verlengen van 5 tot 9 uur.[1] De resultaten bleven echter ongeveer hetzelfde. Bij het verschijnen van de uitgewerkte publicatie van Dauben in 1951 hebben we ons voorschrift kunnen vergelijken met dat van Dauben en zijn medewerkers. Het enige belangrijke verschil bleek gelegen in het feit, dat de auteurs een heldere $LiAlH_4$ oplossing hebben gebruikt. Het lijkt niet onmogelijk, dat sporen metaaloxyden of hydroxyden onze opbrengst nadelig hebben beinvloed (vergelijk blz. 29).

Pogingen tot de bereiding van Δ 5 cholestenon (Birch[6])[2]
1,2 g cholestenonenolacetaat werd opgelost in 10 ml absolute aether en onder roeren aan een volgens Vaughan[72] bereide, in koolzuur-aceton gekoelde, oplossing van KNH_2 in vloeibare NH_3 toegevoegd. Na 1 uur werd de suspensie geschonken in een oplossing van 10 g NH_4Cl in 150 ml water. Dit ging met hevig spatten gepaard. Bij een aantal volgende bewerkingen hebben wij daarom de NH_4Cl oplossing door een gasinleidbuisje in de vloeibare NH_3 gebracht, onmiddellijk gevolgd door 50 ml aether. Hierdoor werd het spatten sterk verminderd en kon de extractie snel worden uitgevoerd. De aetherlaag werd nu afgescheiden en de waterlaag zo snel mogelijk driemaal geextraheerd met porties van 50 ml aether. De gecombineerde extracten werden driemaal met 100 ml water gewassen en een stukje vast CO_2 toegevoegd om nog aanwezige NH_3 te neutraliseren. Na nogmaals wassen met water werd de oplossing op Na_2SO_4 gedroogd. De aether werd afgedestilleerd en het residu omgekristalliseerd uit methanol - aceton (1:1). Bij

1) In samenwerking met de Heer H. Humme (chem. cand.)
2) In samenwerking met de Heer K. de Jong (chem. cand.)

deze eerste drie pogingen werd hierbij in hoeveelheden varierende tussen de 50 en 100 mg een kristallijn product verkregen, dat op grond van de specifieke draaiing onomgezet cholestenonenolacetaat bleek te zijn.

Tabel V

Bereiding	Smeltpunt	$[\alpha]_D$
1	75^o	$-88,8^o$ (c = 1,264 g/100 ml $CHCl_3$)
2	$70 - 75^o$	$-73,5^o$ (c = 1,264 g/100 ml $CHCl_3$)
3	$70 - 75^o$	$-63,3^o$ (c = 1,264 g/100 ml $CHCl_3$

Het smeltpunt en de specifieke draaiing van zeer zuiver cholestenonenolacetaat bedragen resp. 81^o en $-100,4^o$, terwijl voor Δ 5 cholestenon resp. 127^o en $-4,2^o$ wordt opgegeven (Westphal[18]). De moederlogen leverden geen kristallijne producten meer op. Bij een laatste poging werd met een volgens Tost[73] bereide oplossing van KNH_2 in vloeibare NH_3 gewerkt. De koeling met koolzuur-aceton werd achterwege gelaten, zodat de reactie werd uitgevoerd bij -34^o (kp. van NH_3). Door kristallisatie uit aceton - methanol werden enige kristallen verkregen, die bij ongeveer 100^o smolten. Dit is waarschijnlijk onzuiver Δ 5 cholestenon geweest. Wij zijn er niet in geslaagd een zuiver product te isoleren. Chromatografie kon niet worden toegepast, omdat het Δ 5 cholestenon dan tot Δ 4 cholestenon isomeriseert.
Waarschijnlijk is deze isomerisatie de oorzaak van de slechte resultaten en wordt door aanwezigheid van Δ 4 cholestenon de kristallisatie van Δ 5 cholestenon belemmerd.

7 dehydrocholesterol 3 C^{14}
150 mg cholesterylacetaat 3 C^{14} werd opgelost in 4 ml CCl_4 en op een stoombad tot koken verhit met 69 mg broomsuccinimide onder belichting van een Hg lamp. Na 2,5 min. was de reactie beeindigd. Het succinimide werd afgefiltreerd op een glasfilter, gewassen met CCl_4; bij het filtraat werd 0,5 ml collidine gevoegd. Het CCl_4 werd in vacuum bij lage temperatuur afgedestilleerd. Hierna werd 1,25 ml collidine toegevoegd en het mengsel gedurende 10 min. op 140^o verhit in een stikstofatmosfeer. Het reactieproduct werd nu verzeept door 20 min. in stikstofatmosfeer te refluxen met een mengsel van 5 ml alcohol, 0,35 ml H_2O en 175 mg KOH. Hierna werd 10 ml H_2O toegevoegd en het 7-dehydrocholesterol 3 C^{14} in aether opgenomen door het mengsel tweemaal met

aether te extraheren. De oplossing in aether werd gewassen met 1 n H_2SO_4, $NaHCO_3$ oplossing en H_2O. Na drogen op Na_2SO_4 werd de aether afgedestilleerd en het residu gedroogd door toevoegen en weer afdestilleren van absolute benzeen. Hierna werd 0,5 ml pyridine, 0,5 ml benzeen en 250 mg 3,5 dinitrobenzoylchloride in 1 ml benzeen toegevoegd. Na een nacht staan werd 10 ml aceton toegevoegd en het reactiemengsel nog twee uur bij 0^o bewaard. Hierna werden de kristallen afgezogen en gewassen met aceton, water en aceton. Opbrengst 0,1029 g. Het ruwe dinitrobenzoaat werd opgelost in 2 ml benzeen, en 3 ml aceton toegevoegd. Na een nacht staan in de ijskast kon 0,094 g dinitrobenzoaat worden geisoleerd.
Een tweede portie van 146 mg cholesterolacetaat 3 C^{14} werd op dezelfde wijze behandeld. De opbrengst aan ruw dinitrobenzoaat was 0,0976 g. Na omkristalliseren werd 0 0868 g zuiver materiaal verkregen. Totale opbrengst aan zuiver 7-dehydrocholesterol 3,5 dinitrobenzoaat 3 C^{14} was dus 180,8 mg.
Beide porties dinitrobenzoaat werden nu opgelost in 12 ml benzeen en een oplossing van 320 mg KOH in 8 ml methanol toegevoegd. Na een half uur staan bij kamertemperatuur (stikstofatmosfeer) werd met water verdund en het 7-dehydrocholesterol in aether opgelost. De oplossing werd met water gewassen en op Na_2SO_4 gedroogd. Na afdestilleren van de aether werd het residu gedroogd in hoog vacuum. Opbrengst 0,1203 g.
Hiervan werd 0,91 mg opgelost in 100 ml zuivere 96% alcohol en het absorptie spectrum in het ultraviolet opgenomen. Dit vertoonde maxima bij 271, 282 en 293 m en een buigpunt bij 264 m (zie fig. 1, pag. 118). Deze waarden stemmen overeen met de getallen, die in de literatuur worden opgegeven.
Uit de hoogte van de absorptiemaxima werden de gehalten aan 7 dehydrocholesterol en Δ 4-6 cholestadienol berekend. Deze bedroegen resp. 89 en 0,7%.

Vitamine D_3 3 C^{14}

a De bestraling van het provitamine

De bestraling van het 7-dehydrocholesterol 3 C^{14} werd uitgevoerd in het in fig. 11 op blz. 120 getekende apparaat.
Het eigenlijke bestralingsvat is van kwarts en bestaat uit drie compartimenten, die concentrisch de bestralingslamp omgeven. Door het binnenste compartiment A stroomt koelwater, in de tweede afdeling B bevindt zich de filtervloeistof en de te bestralen oplossing wordt door het derde compartiment C gepompt De pomp

bestaat uit een glazen spiraal, die gewonden is om een glazen staaf en precies past in een glazen cylinder. Door snelle rotatie van de spiraal wordt de vloeistof rondgepompt met een snelheid van 100 - 150 liter per uur. Het systeem is van de buitenwereld afgesloten door middel van een glazen lager, dat gemaakt is van een pyrex injectiespuit. Als smeermiddel wordt glycerine gebruikt. De snelheid van de vloeistofstroom is te reproduceren door de glazen dobber in het buisje D op een merkstreep te houden. De spiraalroerder wordt aangedreven door een snellopende roermotor.

Aangezien de capaciteit van de bestralingslamp (een 250 Watt biosollamp) te groot was, werd deze afgeschermd door in het bestralingsvat een koperen buisje aan te brengen, waarin een opening van ongeveer 1 cm hoogte was gemaakt.

Door middel van de kranen E en F wordt de ruimte boven de vloeistof voor de bestraling verschillende malen vacuumgepompt en met stikstof gevuld. Bij deze behandeling kookt de aether steeds even op en worden de laatste resten zuurstof uit de oplossing verwijderd. Wanneer het vacuum niet te hoog is en het glazen lager goed met glycerine is ingesmeerd, dringt geen lucht naar binnen tijdens het vacuum zuigen. Aangezien de kwiklamp enige tijd nodig heeft om op volle capaciteit te komen, hebben wij boven het bestralingsvat een ijzeren koker aangebracht, waar de lamp in getrokken kan worden. Pas na een kwartier branden wordt de biosollamp in het bestralingsvat gebracht. Dit kan in minder dan 1 sec. gebeuren. Door deze inrichting zijn de intensiteit en de tijdsduur bij de bestraling volledig te reproduceren. Alvorens tot de bestraling van het 7 dehydro cholesterol 3 $C^{3,4}$ te kunnen overgaan, moest de tijd nodig om het provitamine tot ongeveer 50% om te zetten worden vastgesteld. Hiertoe werden een aantal charges inactief provitamine gedurende verschillende tijden bestraald en de omzetting gemeten door neerslaan van het onomgezette dehydrocholesterol met digitonine De resultaten worden in tabel VI weergegeven.

Tabel VI

Provitamine 91,5% 7 deh. chol.	dig. sterol na bestraling	opbrengst aan bestralingsprod.	Bestralingstijd
110 mg	62,7 mg	47,3 mg	6 min.
110 mg	60,5 mg	49,5 mg	7 min.
110 mg	59,4 mg	50,6 mg	7,5 min.
110 mg	58,6 mg	51,4 mg	7,5 min.

De uitkomsten zijn redelijk reproduceerbaar. Het aldus verkregen bestralingsproduct bleek steeds voor ongeveer 47% uit vitamine D_3 en 25% uit tachysterol te bestaan (zie hoofdstuk III blz95). 120 mg 7-dehydrocholesterol 3 C^{14} werd nu op de hierboven beschreven wijze in 135 ml peroxyd-vrije aether gedurende 7½ min. bestraald. Bij de behandeling met digitonine werd 298,5 mg neergeslagen, d.w.z. er was nog 72 mg onomgezet materiaal aanwezig. Van het voor de bestraling aanwezige 7 dehydrocholesterol had zich dus 44,5% omgezet. Dat dit percentage wat lager lag dan bij de voorproeven, werd waarschijnlijk veroorzaakt door zwakke aanslag aan de binnenwand van het bestralingsvat.

De overmaat digitonine werd nu verwijderd door het filtraat met 150 ml aether in een scheitrechter te brengen en 180 ml verzadigde NaCl oplossing en 180 ml H_2O toe te voegen. De waterlaag werd afgescheiden en verschillende malen goed met aether geëxtraheerd. De verzamelde aetherextracten werden met water gewassen, de aether afgedestilleerd en het residu gedroogd door toevoegen en weer afdestilleren in vacuum van absolute benzeen - absolute alcohol 1:1 en absolute benzeen.

b De isolering van vitamine D_3 3 C^{14} uit het bestralingsproduct
Voorproeven met inactief materiaal

Chromatografie van lumisterol 2 met Soedan III.
25 mg lumisteryl 2 acetaat werd opgelost in 3 ml dioxaan en verzeept met 5 ml 2 n KOH in methanol. Na 10 min op een waterbad verwarmen onder stikstof werd 15 ml H_2O toegevoegd en het lumisterol 2 in aether opgenomen. De oplossing werd met water gewassen en tot 100 ml aangevuld. Hiervan werd 5 ml drooggedampt en het residu opgelost in 50 ml zuivere 96% alcohol en de u.v. absorptie bij enige golflengten bepaald. De resterende 95 ml oplossing in aether werden drooggedampt, het residu opgenomen in 10 ml petroleumaether en 1 ml van een oplossing van Soedan III in petroleumaether (12 5 mg/liter) toegevoegd. De oplossing werd gechromatografeerd over 10 g Al_2O_3 (sterkte III volgens Brockmann, verkregen door 100 g Al_2O_3 van Merck te schudden met 2.5 ml H_2O). Na ontwikkeling met 25 ml petroleumaether kon met petroleumaether plus 1% aethanol de Soedan III band worden geelueerd.
Het eluaat werd op 100 ml gebracht. 5 ml van deze oplossing drooggedampt, opgenomen in 47 5 ml alcohol en wederom bij dezelfde golflengten de u.v. absorptie bepaald.

Tabel VII

	E voor de chrom.	E na de chrom.
220 m	0,027	0,116 (S III)
230 m	0,057	0,048
240 m	0,108	0,096
250 m	0,248	0,208
260 m	0,393	0,377
271,5 m	0,525	0,515

Het blijkt uit de tabel, dat ongeveer 90% van het lumisterol tegelijk met het Soedan III wordt geëlueerd. Een scheiding tussen vitamine D en lumisterol is dus op deze wijze niet mogelijk.

Isolering van vitamine D_3 uit bestralingsproduct door chromatografie van het dinitrobenzoaat

Met digitonine sterolvrij gemaakt bestralingsproduct (kleuring met Nield's reagens kwam overeen met 1,315 S.E. *vitamine D*) werd opgelost in 10 ml benzeen, 1 ml 10% maleinezuuranhydride oplossing in benzeen toegevoegd en 3/4 uur in koolzuuratmosfeer op 75° verhit. Nadat de benzeen in vacuum was afgedestilleerd, werd 10 ml 2 n KOH in methanol toegevoegd en het mengsel ½ uur op kamertemperatuur bewaard. Hierna werd 20 ml H_2O toegevoegd en de oplossing zorgvuldig met aether geextraheerd. Van de oplossing in aether werd een kleine hoeveelheid gebruikt voor een colorimetrische bepaling met Nield's reagens. Het bleek, dat nog 1,074 S.E. *vitamine D* aanwezig was.

Het extract werd drooggedampt in vacuum. Na drogen door toevoegen en weer afdestilleren van absolute alcohol -benzeen en benzeen werd het residu opgenomen in 2 ml benzeen en 1 ml pyridine, 2 ml 20% 3,5 dinitrobenzoylchloride oplossing in benzeen werd toegevoegd en het mengsel ½ uur bij kamertemperatuur bewaard. Hierna werd de benzeen afgedestilleerd en 5 ml pyridine toegevoegd. Het mengsel werd nu met 20 ml H_2O in een scheitrechter gebracht en met aether geëxtraheerd. De oplossing in aether werd gewassen met water, drooggedampt en gedroogd door toevoegen en weer afdestilleren met methylaethylketon. Het residu werd opgenomen in 10 ml petroleumaether, bevattende 8% aether. Hierbij ontstond een kristallijn residu (stof X), dat later werd onderzocht. De vloeistof werd afgegoten en de stof X nog

verschillende malen met petroleumaether, bevattende 8% aether, gewassen. De gedecanteerde vloeistof en de wasvloeistoffen werden over 10 g Al_2O_3 (sterkte III Brockmann) gechromatografeerd. Het elueermiddel was eveneens petroleumaether met 8% aether. In totaal werd 50 ml gebruikt. Het eluaat werd drooggedampt en het residu opgenomen in 2 ml dioxaan. Na toevoeging van 5 ml 2 n KOH in methanol werd het mengsel een half uur bij kamertemperatuur bewaard. Hierna werd 20 ml H_2O toegevoegd en verschillende malen met aether geextraheerd.
De oplossing in aether werd terdege met water gewassen. Uit een meting met Nield's reagens bleek, dat nog 0,96 SE vitamine D aanwezig was. Het u.v. absorptiespectrum wordt door fig. 4 op pag. 112 weergegeven. Zie ook pag. 52.
Het drooggewicht van het praeparaat bedroeg ongeveer 20% meer dan op grond van de aanwezige vitamine hoeveelheid te verwachten was. Mogelijk waren dus nog kleine hoeveelheden lumisterol, overbestralingsproducten of andere onzuiverheden, zoals oxydatieproducten of verontreinigingen uit de gebruikte reagentia aanwezig.

Onderzoek van de stof X

Het met petroleumaether (+ 8% aether) verkregen neerslag werd opgelost in 2 ml dioxaan. 5 ml 2 n KOH in methanol toegevoegd en het mengsel 10 min. op 80° verhit. Hierna werd 20 ml H_2O toegevoegd en met aether geextraheerd. De oplossing in aether (opl. A) werd goed met water gewassen en tot 100 ml aangevuld. Hiervan werd 10 ml drooggedampt, het residu (de stof Y) gedroogd met alcohol – cyclohexaan 1:1 en cyclohexaan, en opgenomen in cyclohexaan. Deze oplossing gaf een kleurreactie met Nield's reagens, die overeenkwam met 0,128 SE vitamine D_3.
Van de cyclohexaanoplossing die na de bepaling met Nield's reagens was overgebleven werd nu 2 ml verdund tot 10 ml en het u.v. absorptiespectrum opgenomen. Zie fig. 2 op pag. 118.
De resterende oplossing A werd nu drooggedampt, het residu opgenomen in 10 ml petroleumaether en 1 ml van een Soedan III oplossing in petroleumaether (12,5 mg per 1000 ml) toegevoegd. Het aldus verkregen mengsel werd gechromatografeerd over 10 g Al_2O_3. Nadat 35 ml petroleumaether door de kolom was gegoten, werd de Soedan III band geelueerd met petroleumaether + 1% aethanol. Het geelueerde product gaf een kleuring met Nield's reagens. Het ultraviolet absorptiespectrum wordt in fig. 3, pag. 118 weergegeven. Er is absoluut geen gelijkenis met het spectrum

van vitamine D, zodat we hier te maken hebben met een onbekend product dat evenals vitamine D met Nield's reagens kleurt.

De isolering van vitamine D_3 3 C^{14} uit het bestralingsproduct

Het op de op blz. 76 beschreven wijze verkregen sterol- en digitoninevrije, radioactieve bestralingsproduct werd op de hierboven beschreven wijze met maleinezuuranhydride behandeld en door chromatografie van het 3,5 dinitrobenzoaat gezuiverd. Als bijproduct werd weer de onbekende stof X geisoleerd. Het dinitrobenzoaat werd tenslotte weer met KOH in methanol verzeept en het vitamine D_3 3 C^{14} praeparaat in aether opgenomen. De oplossing in aether werd goed met water gewassen, de aether afgedestilleerd en het residu gedroogd door toevoegen en weer afdestilleren van cyclohexaan - alcohol 1 1 en cyclohexaan. Het residu werd tenslotte opgelost in 100 ml cyclohexaan. Van deze oplossing (opl. A) werd 2 ml drooggedampt en het residu opgenomen in 20 ml cyclohexaan (opl. B). Hiervan werd 0,4 ml gepipetteerd in een cuvetje en 4 ml Nield's reagens (20 g $SbCl_3$ opgelost in 100 ml $CHCl_3$ + 2 ml acetylchloride) toegevoegd. De intensiteit van de extinctie bij 500 mμ werd na 1 min. gemeten. Deze wees op de aanwezigheid van 174 mg vitamine D_3 3 C^{14} in oplossing A (zie hoofdstuk III). De resterende 19,6 ml van oplossing B werden gebruikt voor het opnemen van het u.v. absorptiespectrum (hierbij ging niets verloren) en voor bepaling van de radioactiviteit. Het u.v. spectrum vertoonde goede overeenkomst met dat van zuiver vitamine D_3. Zie figuren 6 en 7 op pag. 118 en 119.

Aan oplossing B werden enige mg kristallijn vitamine D_3 toegevoegd en de oplossing drooggedampt. Het residu werd in een klein glazen buisje overgebracht volgens een methode, die op pag. 110 wordt beschreven.

Na drogen in hoogvacuum bleek het gewicht 6,96 mg te zijn. Volgens de hierboven beschreven vitamine D_3 bepaling met $SbCl_3$ moet dit residu bevatten 0,34 mg vitamine D_3 3 C^{14}. De 6,96 mg *verdund* vitamine D_3 3 C^{14} werd verbrand tot CO op de in hoofdstuk II beschreven wijze. De activiteit van het verkregen $BaCO_3$ werd in een oneindige dikke laag gemeten. Deze bedroeg 397 tikken/min. De activiteit van het niet verdunde praeparaat zou dus 8100 tikken/min. hebben bedragen. Op grond van de activiteit van het cholesterylacetaat zouden wij ongeveer 6000 tikken/min. verwachten. Het blijkt dus, dat behalve vitamine D_3 3 C^{14} ook nog 20 - 25% andere radioactieve producten aanwezig waren. Dit is in overeenstemming met het drooggewicht van de praeparaten,

die bij de voorproeven met inactief materiaal zijn verkregen (zie pag. 78).
De oplossing A werd nu gemengd met 7,75 g arachisolie,waarna het cyclohexaan in vacuum tenslotte in hoogvacuum werd verwijderd. De aldus verkregen olieoplossing bevatte 20.200 IE vitamine D_3 3 C^{14} per 0,25 ml.
De onbekende kristallijne stof, die bij de chromatografie van het dinitrobenzoaat was neergeslagen, werd verzeept op de reeds bij de voorproeven met inactief materiaal aangegeven wijze en van het verzeepte product (stof Y) het u.v. spectrum opgenomen. Dit bleek volkomen identiek te zijn met het bij de voorproeven met inactief materiaal verkregen spectrum.

Pogingen tot de isolering van vitamine D_3-cholesterol uit het bestralingsproduct

1 110 mg provitamine D_3 (91,5% u dehydrocholesterol) werden in 140 ml aether gedurende 7,5 min. bestraald in het op pag.120 beschreven bestralingstoestel. Cholesterol en onomgezet 7 dehydrocholesterol werden op de op pag.110 beschreven wijze met digitonine verwijderd. Het bleek, dat 50,6% van het 7-dehydrocholesterol was omgezet.Het van digitonine bevrijde bestralings product werd opgelost in petroleumaether en in een klein erlenmeyertje overgespoeld. De petroleumaether werd verwijderd in een vacuumexsiccator door zacht met een waterstraalpomp te zuigen en tegelijkertijd uit een niet al te nauwe capillair stikstof over het praeparaat te blazen. Op deze wijze werd condensatie van vocht in het erlenmeyertje vermeden. De laatste resten petroleumaether werden in hoogvacuum verwijderd. Het residu werd nu tezamen met 35 mg cholesterol opgelost in 0,5 ml aceton. Na toevoeging van 1 druppeltje water en enten met vitamine D_3-cholesterol trad spoedig kristallisatie op. Het kristallijne product werd afgezogen en gewassen met aceton-water. Ter bepaling van het vitamine D_3 gehalte werd 0.969 mg opgelost in 20 ml $CHCl_3$. Van deze oplossing werd 0,2 ml in een cuvet gepipetteerd, 2 ml Nield's reagens toegevoegd en de extinctie gemeten. Deze kwam overeen met 5500 IE. Als de dubbelverbinding zuiver was geweest, had dit ongeveer 20.000 IE moeten bedragen. Ons product was verder enigszins gekleurd en nogal kleverig.
2 Bij een tweede poging werd de dubbelverbinding uit aceton gekristalliseerd. Op de onder 1 beschreven wijze bereid bestralingsproduct werd opgelost in 0,3 ml aceton en na enten met vitamine D_3-cholesterol een nacht in de ijskast bewaard. De

bodem van het erlenmeyertje was bedekt met kristalnaalden. Deze werden afgezogen en twee maal gewassen met een kleine hoeveelheid ijskoude aceton. De opbrengst was 39 mg. 1,13 mg werd opgelost in 40 ml $CHCl_3$; hiervan werd 0,2 ml in een cuvet gepipetteerd en 2 ml Nield's reagens toegevoegd. Extinctiemeting gaf 8680 IE. Het geisoleerde product bevatte dus slechts 7,5 mg van de 23 mg vitamine D_3, die in het bestralingsproduct aanwezig waren.

HOOFDSTUK II

METING VAN DE RADIOACTIVITEIT VAN DE MET C^{14} GEMERKTE PRAEPARATEN[1)]

PAR. 1 INLEIDING EN OVERZICHT

Op het ogenblik wordt bij de metingen van radioactiviteit meestal gebruik gemaakt van zg. Geiger Müller telbuizen. Moderne telbuizen bestaan uit een klokvormige kathode en een centraal aangebrachte draadvormige anode. Het geheel is omgeven door een glazen mantel, waarin aan de onderkant een zeer dun mica membraan van bijv. 1,5 mg/cm^2 is aangebracht, waar zelfs electronen met geringe energie doorheen kunnen komen. De buis is gevuld met gas. Hiertoe wordt vaak een mengsel van argon en alcoholdamp van atmosferische of lagere druk gebruikt. Wanneer er een positieve spanning van ongeveer 1000–1500 Volt op de anode wordt gebracht, dan veroorzaakt ieder geladen deeltje, dat door het membraan het gevoelige volume van de telbuis binnendringt, een ionisatie van de gasvulling. De hierdoor ontstane stroomstoot wordt door middel van een versterkerschakeling, gecombineerd met een mechanisch telwerk, geregistreerd.

Voor een nadere beschrijving van telbuizen en registratie apparaten verwijzen wij naar de literatuur[74,75,76]. Wij hebben gebruik gemaakt van de electronenteller, type 6501, en de telbuis, type M 1, beide van Bruel en Kjaer. De telbuis had een mica venster van 14 mm diameter met een gewicht van 2–2.5 mg/cm^2. Bij de metingen van radioactiviteit moet met de volgende factoren rekening worden gehouden

1 Radioactieve praeparaten zenden stralen (deeltjes) uit in alle richtingen. Slechts een gedeelte hiervan komt in het gevoelige volume van de telbuis. Bij de meeste telbuizen bedraagt de geometrische efficiency niet meer dan 25%. Om de radioactiviteit van verschillende praeparaten nauwkeurig te kunnen vergelijken, is het zeer belangrijk, dat deze steeds in dezelfde positie t.o.v. de telbuis worden aangebracht. Kleine veranderingen in de

1) In samenwerking met de Heer M.S. de Groot (Chem. Cand.) en de dames J.F. Voorwijk en M.J. van Eyk.

afstand kunnen reeds grote verschillen in de gemeten activiteit teweeg brengen.

2 Vooral bij vergelijkende metingen is het van belang, dat het praeparaat steeds op hetzelfde onderliggende materiaal wordt aangebracht. De in alle richtingen uitgezonden deeltjes worden nl. door de achtergrond gereflecteerd en wel meer, naarmate deze dikker is of een zwaarder element bevat. Wij hebben steeds een messing plaatje ter grootte van een cent als ondergrond gebruikt.

3 Alle tellers hebben tengevolge van in de omgeving aanwezige radioactieve stoffen en van de kosmische straling een nuleffect. Teneinde dit nuleffect klein te maken, worden de tellers omgeven door een loodmantel, waarbinnen het te meten praeparaat kan worden aangebracht. Om de activiteit van een praeparaat te bepalen meten wij dus eerst de activiteit van het monster en het nuleffect tezamen. De gevonden waarde wordt verminderd met het bedrag van het afzonderlijk gemeten nuleffect. Dit laatste bedroeg in ons laboratorium bij gebruik van de reeds genoemde apparatuur ongeveer 3–4 tikken/min.

4 Direct na een ontlading is de telbuis enige tijd gevoelig voor ioniserende deeltjes, die in de buis doordringen. Deze zg. dode tijd is van de orde van 10^{-4} sec.
Bij het meten van sterk actieve praeparaten zullen dus steeds enkele ioniserende deeltjes niet worden geregistreerd.

5 De nauwkeurigheid van radioactiviteitsmetingen wordt beperkt door het feit dat de desintegratie van de atoomkern plaats vindt op een niet te voorspellen moment. Wij hebben bij alle metingen de middelbare statistische fout berekend. Deze is gelijk aan de wortel uit het aantal waargenomen impulsen. De middelbare fout zal procentueel kleiner worden naarmate gedurende een langere tijd wordt gemeten. Terwijl bij praeparaten met een hoge activiteit de fout van het nuleffect verwaarloosd mag worden, is dit bij zwakke praeparaten niet het geval. De totale middelbare statistische fout wordt dan gegeven door

$$F = \sqrt{N_s + N_b}$$

waarin N_s en N_b de totale aantallen aanslagen zijn van het praeparaat plus nuleffect, resp. nuleffect alleen.

6 Teneinde variaties in de gevoeligheid van de telapparaten te elimineren, hebben wij steeds alle activiteitswaarden vergeleken met de momentele activiteit van een uraanstandaard en omgerekend op een standaardwaarde van 1400 tikken per min.

7 Absorptie en zelfabsorptie

Deze beide factoren spelen vooral een belangrijke rol bij meting van zachte β-straling. De uitgezonden deeltjes worden nl. door het praeparaat zelf, de lucht tussen het praeparaat en de telbuis en het venster van de telbuis geabsorbeerd.

De door C^{14} uitgezonden straling heeft een max. energie van 0,154 MeV en wordt reeds volledig geabsorbeerd door een Al folie van ongeveer 30 mg per cm^2 of een laagje $BaCO_3$ van ongeveer 20 mg per cm^2. Zelfs een zeer dun mica venster van 1 a 2 mg per cm^2 laat nog maar 75% van de straling door.

Door de optredende absorptieverschijnselen, gecombineerd met de geometrische factoren bereikt slechts ongeveer 2% van de in totaal door een monster $BaC^{14}O_3$ uitgezonden deeltjes het gevoelige volume van de telbuis. Zijn zij eenmaal binnen dan worden zij ook geregistreerd. De efficiency van de telbuis is voor β-stralen ongeveer 100%. Voor γ-stralen bedraagt hij slechts 1% of lager.

Uit het bovenstaande zal het duidelijk zijn, dat opstellingen waarbij het te meten praeparaat buiten de telbuis wordt aangebracht niet ideaal zijn, vooral wanneer zeer zwakke praeparaten gemeten moeten worden. Men heeft dan ook buizen ontworpen, waar het te meten praeparaat in de telbuis kon worden geplaatst. De verliezen door absorptie zijn dan veel minder en de geometrische efficiency kan tot ongeveer 50% worden opgevoerd. Nog betere resultaten worden verkregen door het actieve materiaal in gasvorm (bijv. CO_2 of CH_4) in het gevoelige volume van de buis te brengen.

Aangezien echter de beide laatste methoden nogal veel practische moeilijkheden opleveren, vindt de telbuis met het mica venster toch nog de meeste toepassing.

De met het telmechanisme waargenomen activiteit neemt in het algemeen toe, naarmate van een bepaalde stof een dikkere laag gemeten wordt. Bij een zwakke straler als C^{14} zal echter reeds bij tamelijk dunne praeparaten een gedeelte van de uitgezonden β-straling door het praeparaat zelf weer worden geabsorbeerd. Tengevolge van deze zg. zelfabsorptie zullen bij een bepaalde dikte van het monster de stralen, afkomstig van de onderste laag

van het actieve materiaal het bovenoppervlak niet meer kunnen bereiken. We noemen het praeparaat dan *oneindig dik* en de activiteit heeft een maximale waarde bereikt. Het is duidelijk dat bij een oneindig dikke laag het *strooieffect* van de koperen ondergrond te verwaarlozen is.
In fig. 14 pag. 121 wordt het verband weergegeven tussen het waargenomen aantal tikken en de laagdikte van een $BaCO_3$ praeparaat in mg/cm^2. Aangezien de vorm van de kromme enigszins afhankelijk is van de experimentele opstelling, is het wenselijk voor iedere apparatuur een dergelijke curve vast te stellen en deze dus niet aan de literatuur te ontlenen.
Het is ook mogelijk door voor de zelfabsorptie een experimenteel verloop aan te nemen (wat slechts bij benadering juist is) een zelfabsorptiecurve te berekenen[75]. Wanneer men met behulp van deze curve uit de activiteit van dikke praeparaten, die van zeer dunne praeparaten berekent, dan vindt men in de regel te lage resultaten. Deze afwijking heeft zijn oorzaak in de verstrooiing van de β-straling, die optreedt in niet al te dunne praeparaten en die vooral naar boven gericht is. In uiterst dunne monsters, waar deze verstrooiing afwezig is, ontbreekt deze extra concentratie in bovenwaartse richting.
Wanneer we de activiteit van twee monsters van dezelfde stof willen vergelijken, dan kunnen we van de monsters twee laagjes van dezelfde dikte maken en hiervan de activiteit meten. Het is echter het meest eenvoudig met *oneindig dikke* lagen te werken, omdat de beide monsters dan niet precies dezelfde dikte behoeven te hebben. Wanneer echter bijv. door gebrek aan materiaal toch met lagen van eindige dikte moet worden gewerkt, dan kan met behulp van een kromme als in fig. 15 pag. 121 wordt aangegeven, de bij een oneindig dikke laag behorende activiteit worden berekend.
Willen we de activiteit van verschillende praeparaten vergelijken, dan moeten we er rekening mee houden, dat de zelfabsorptie in beide stoffen verschillend kan zijn. Het is daarom gebruikelijk organische stoffen, die C^{14} bevatten te verbranden tot CO_2, dit om te zetten in $NaCO_3$ en hiervan de activiteit te meten.

PAR. 2 DE VERBRANDING VAN ORGANISCHE STOFFEN VOLGENS VAN SLIJKE-FOLCH

De door van Slijke en Folch ontwikkelde methode voor de verbranding van organische stoffen langs de *natte weg* heeft bij de elementairanalyse niet veel toepassing gevonden, omdat men naast het koolstofgehalte ook steeds het waterstofgehalte wenst

te kennen. Bij de bepaling van de radioactiviteit van koolstofverbindingen speelt deze overweging geen rol, en vindt de methode van Van Slijke-Folch hier tengevolge van zijn eenvoud veel toepassing.
Over de uitvoering van de verbranding zijn verschillende publicaties verschenen. Wij hebben gebruik gemaakt van de door Aten[75] aangegeven methode. Deze komt in het kort op het volgende neer.
De organische stof wordt verbrand door verhitting met het oxydatiemiddel van Van Slijke-Folch, bestaande uit een mengsel van CrO_3, KJO_3, H_3PO_4 en rokend H_2SO_4. Het ontwijkende CO_2 wordt door middel van een luchtstroom quantitatief in barietwater geleid. Het neergeslagen $BaCO_3$ kan op de gewone wijze worden afgezogen, nadat aan het barietwater een verzadigde NH_4Cl oplossing is toegevoegd. Hierdoor wordt vermeden, dat CO_2 uit de atmosfeer wordt opgenomen. Het $BaCO_3$ wordt gewassen met alcohol en aether en gedroogd in een vacuumexsiccator. Voor verdere details verwijzen wij naar het experimentele gedeelte van dit hoofdstuk. Wij zullen thans eerst onze resultaten beschrijven en in verband hiermede een vergelijking maken met de publicaties van andere onderzoekers.

6 monsters van 3,5 – 7 mg cholestenon werden verbrand op de hierboven aangegeven wijze. De opbrengst aan $BaCO_3$ bleek steeds 100–105% van de theoretische berekende hoeveelheid te zijn.
Wij hebben getracht de oorzaak van deze te hoge waarde op te sporen:

1 Er werd een groot aantal blanco proeven gedaan. Hierbij ontstond absoluut geen neerslag. Het apparaat was dus niet lek en er werd geen CO_2 (ontstaan door oxydatie van verontreinigingen), SO_2 of SO_3 opgevangen.

2 Het leek niet onmogelijk, dat het $BaCO_3$ verontreinigd was met sporen $BaSO_4$. Het neerslag loste echter volkomen op in verdund HCl.

3 Verder werd gedacht aan een onjuiste wijze van drogen van het $BaCO_3$. Het door wassen met alcohol en aether en drogen in een vacuumexsiccator verkregen $BaCO_3$ werd gewogen en hierna 7 uur op 100° C in een droogstoof verwarmd. Het gewicht bleek door deze laatste bewerking niet meer af te nemen.

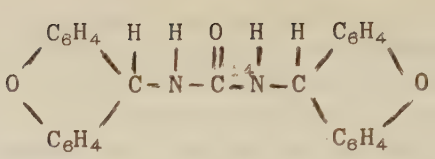
4 Volgens Van Slijke, Page en Kirk[77] kunnen bij de verbranding ook kleine hoeveelheden SO_2 ontstaan. Het $BaCO_3$ neerslag zou dan $BaSO_3$ moeten bevatten. Wij hebben getracht met de gewone methoden van de qualitatieve analyse (ontkleuring van broomwater, of jodiumstijfseloplossing) in het $BaCO_3$ sulfiet aan te tonen, doch zijn hierin niet geslaagd.

Hoe is nu te verklaren, dat in de talrijke mededelingen in de literatuur over koolstofbepalingen met behulp van de oxydatie langs de *natte* weg, vrijwel nooit te hoge C-waarden worden opgegeven.
Wij zullen hiertoe enige publicaties eens wat nader bekijken.

Volgens de door Van Slijke[77,78] aangegeven methoden wordt de te onderzoeken stof verbrand met het chroomzuuroxydatiemengsel en het CO_2 opgevangen in verdund CO_2-vrije NaOH. Het CO_2 wordt door een geraffineerde methodiek quantitatief van de verbrandingsbuis naar het gasabsorptievaatje overgebracht. Door aanzuren van de alkalische oplossing met melkzuur in plaats van met zuren wordt alleen het $BaCO_3$ en niet eventueel aanwezig sulfiet ontleed. Het vrijkomende CO_2 wordt manometrisch bepaald. De gehele methode maakt een betrouwbare indruk. Voor ons doel, de bereiding van $BaCO_3$ praeparaten, is hij echter te gecompliceerd.

Lindenbaum Schubert en Armstrong[9] hebben een zeer eenvoudig apparaat ontworpen. Het transport van CO_2 van de verbrandingsbuis naar het absorptievaatje met barietwater wordt aan diffusie overgelaten. Weliswaar wordt het apparaat voor de verbranding vacuum gezogen, doch tijdens de verbranding ontstaat door de ontleding van KJO_3 ook O_2. Deze zuurstof zal ongetwijfeld de diffusie van het CO_2 bemoeilijken. Het lijkt ons goed mogelijk, dat in de door Lindenbaum gebruikte tijd van 20 min. de absorptie van het CO_2 niet helemaal volledig is geweest. Het feit, dat toch 100% opbrengst wordt gevonden is misschien door de aanwezigheid van SO_2 of het insluiten van bariumoxyden of hydroxyden in het $BaCO_3$ te verklaren.

In de literatuur werd een aanwijzing gevonden, dat de diffusie in het toestel van Lindenbaum in 20 min. werkelijk onvolledig is. Armstrong, Singer, Zbarsky en Bryant Dunshee[80] hebben volgens de methode van Lindenbaum e.m. met C^{14} gemerkt xanthydrolureide verbrand.



Bij een aantal oxydaties werden zeer uiteenlopende waarden voor de activiteit van het $BaCO_3$ gevonden. Armstrong e.m. hebben nu het CO_2 dat bij de verbranding gevormd wordt in verschillende fracties opgevangen. Het bleek nu, dat vrijwel alle radioactiviteit in de laatste fractie aanwezig was. De C-atomen uit de xanthydrolresten worden dus blijkbaar het eerste door het oxydatiemiddel aangegrepen en daarna pas het C^{14} atoom uit het ureum. Het is duidelijk, dat wanneer in dit geval de CO_2 onvolledig wordt geabsorbeerd, bij de bepaling een grote fout wordt gemaakt. Armstrong e.m. hebben de moeilijkheden overwonnen door zowel de verbrandingstijd als diffusietijd op te voeren.

Hoewel wij geen $BaSO_3$ in het $BaCO_3$ neerslag hebben kunnen aantonen, werd toch getracht de uitkomsten van onze analyses te verbeteren door het SO_2 als storende factor uit te schakelen.
Het zou natuurlijk het beste zijn geen H_2SO_4 in het verbrandingsmengsel te gebruiken, doch hierbij stuiten wij op practische bezwaren. Verhoging van het CrO_3 gehalte in het oxydatiemiddel gaf vrijwel geen verbetering. Steeds werd 101-104% van de theoretisch berekende hoeveelheid $BaCO_3$ verkregen. Wij hebben gewerkt met een oxydatiemengsel van de volgende samenstelling: 72 ml rokend H_2SO_4 (20% SO_3), 36 ml H_3PO_4 (s.g. 1,75) en 10 g CrO_3. Het mengsel werd om sporen koolstofverbindingen te verwijderen 15 min. op 160° verhit. Het KJO_3 werd bij de verbranding steeds in vaste vorm (± 200 mg) toegevoegd.
Door de verbrandingsgassen te leiden door een wasflesje met $KMnO_4$ + verdund H_2SO_4 of een 40% $HClO_4$ oplossing hoopten wij SO_2 te kunnen tegenhouden. De uitkomsten van de analyses vertoonden echter geen verbetering.
Thorn en Ping Shu[81] verkregen goede resultaten met een apparaat waar tussen de verbrandingsbuis en het CO_2-absorptievaatje een buis met zinkdraaisel en vast KJ was aangebracht. Het zink diende om zure dampen, die bij de verbranding ontstaan tegen te houden, terwijl door het KJ jodiumdampen, die bij de verbranding ontstaan werden geabsorbeerd.

Wij hebben in onze opstelling een dergelijke buis met Zn en KJ aangebracht. De uitkomsten van de verhoudingen vertoonden echter geen verbetering. Het zinkdraaisel bleek vrijwel niet in staat SO_2 tegen te houden. Wij hebben nl, in de verbrandingsbuis een bekende hoeveelheid natriumbisulfiet met zuur behandeld. Het vrijkomende SO_2 werd met CO_2 vrije lucht in barietwater geleid. Tussenschakeling van een buis Zn + KJ had geen invloed op de hoeveelheid $BaSO_3$ die ontstond.
Thorn en Ping Shu gebruikten in hun opstelling dezelfde vacuumtechniek als Lindenbaum, zodat onvolledige absorptie van het CO_2 niet uitgesloten lijkt.

Door bovenstaande onderzoekingen wordt het zeer waarschijnlijk, dat SO_2 een storende factor bij de bepaling is. Wij hebben daarom gedacht aan een mogelijke insluiting van bariumoxyden of hydroxyden in het $BaCO_3$. In de literatuur[82] werd hierover ook een aanwijzing gevonden. Door inplaats van een verzadigde $Ba(OH)_2$ oplossing (0,2 n) een halfverzadigde oplossing te gebruiken werden aanzienlijk betere uitkomsten verkregen. De hoeveelheden $BaCO_3$ varieerden tussen de 99 en 101% van de theoretische berekende hoeveelheid.

PAR. 3 EXPERIMENTELE GEGEVENS

A Uitvoering van de verbranding, zie fig. 12 op pag. 120.
In het verbrandingsvat A wordt een Pt schuitje met 3–8 mg van de te verbranden stof en 200 mg KJO_3 gebracht. Hierna wordt gedurende 45 min. lucht door het apparaat gezogen, die door de wasfles B met 50% KOH CO_2 vrij is gemaakt. De stroomsnelheid is te regelen door in de drukregelaar C een of meerdere capillairen in werking te stellen. Via het glasfilter D wordt nu 12 – 15 ml verzadigde $Ba(OH)_2$ oplossing (0,2 N) in E gebracht. Dit gaat gemakkelijk omdat in het toestel een geringe onderdruk bestaat. Hierna wordt 8 ml van het verbrandingsmengsel van Van Slijke-Folch zie pag. 88 vanuit F in A gebracht. De stroomsnelheid wordt op 2 bellen per sec. (in E) gehouden. De buis A wordt nu langzaam verwarmd tot 250° C en ongeveer 5 min. op deze temperatuur gehouden. Hierbij ontstaan SO_3 nevels. Deze komen echter niet hoger dan de verbindingsbuis G tussen A en E. Sporen SO_3 worden nog door een glasfilter, dat in G is aangebracht tegengehouden Na 5 min. wordt de vlam verwijderd. Tijdens het afkoelen de doorstroomsnelheid van de lucht op dezelfde waarde houden Na

drie kwartier de luchtstroom stoppen en via D 12 tot 15 ml verzadigde NH_4Cl oplossing in E brengen. De gevormde neerslag wordt op een glasfilter afgezogen, gewassen met water, alcohol en aether, gedroogd in een vacuumexsiccator en gewogen.
Het bleek dat een beter afzuigbaar neerslag wordt verkregen door tijdens de praecipitatie het barietwater op ongeveer 50^{o} te verwarmen.

B Bereiding en activiteitsbepaling van $BaCO_3$ monsters
Om een juiste vergelijking te kunnen maken van de radioactiviteit van de verschillende praeparaten $BaCO_3$ is het noodzakelijk hiervan praeparaten te maken, die zo gelijkmatig mogelijk van dikte zijn. Hiertoe hebben wij gebruik gemaakt van de door Aten[75] beschreven methode.
Een rond messing plaatje A werd vastgeperst tegen een messing cylinder B door middel van een tweede cylinder, die uit twee uit elkaar schroefbare helften C en D bestaat (fig 13, pag 120). Het radioactieve $BaCO_3$ werd nu in een agaten mortier fijngewreven met 96% alcohol, waarna de suspensie met een pipet in het messingvat werd gebracht. Nadat het neerslag zich had afgezet, werd de alcohol door voorzichtig verwarmen van boven met een gewone lamp van 150 Watt of een infrarood lamp, langzaam verdampt. Als het praeparaat droog was, werd de schroefdeksel verwijderd en de cylinder B voorzichtig van het $BaCO_3$ losgemaakt. Met behulp van een verticaal op een plaatje gemonteerde staaf, welke door de opening in de bodem van D werd gestoken, kon het messing plaatje met $BaCO_3$ omhoog gedrukt worden. Dit werd in een ondiep aluminiumbakje overgebracht. Het telmonster was nu gereed en kon liggend in een metalen schuif onder het venster van de G.M. teller worden gebracht.

Hoewel wij in de regel over voldoende $BaCO_3$ beschikten om *oneindig* dikke telpraeparaten te kunnen maken, werd in sommige gevallen toch een laag verkregen van minder dan 20 mg/cm^2 dikte. De gevonden activiteit werd dan met behulp van een absorptiekromme omgerekend op de bij een oneindig dikke laag behorende waarde. De absorptiekromme hebben we bepaald door van een aantal praeparaten actief $BaCO_3$ van verschillende dikte de activiteit te meten. In fig. 14, pag. 121 wordt het resultaat van onze metingen weergegeven. Het bij een meting waargenomen aantal impulsen varieerde tussen de 40.000 en 120.000. Volgens pag. 83 zal de middelbare statistische fout dus schommelen tussen de 0.5 en 0.3%
Teneinde gevoeligheidsvariaties van de telapparatuur te

elimineren werd voor iedere meting de activiteit bepaald van een uraanstandaard. Deze varieerde tussen de 1350 en 1450 tikken/min. De activiteit van het $BaCO_3$ praeparaat werd steeds omgerekend op een standaardwaarde van 1400 tikken/min. De middelbare statistische fout bij meting van de uraanstandaard werd beneden de 0,36% gehouden.
De totale middelbare statistische fout in de einduitkomst wordt dan ongeveer 0,6%. Uit tabel 2 volgt dat de werkelijke afwijkingen bijv. door constructiefouten in de $BaCO_3$ plaatjes, enkele procenten bedragen.
Om de extrapolatie van een gemeten activiteit naar *oneindige* laagdikte gemakkelijk te kunnen uitvoeren, hebben wij in fig. 15 pag. 121, de activiteit van de verschillende $BaCO_3$ plaatjes als fractie van de activiteit van een plaatje van *oneindige* dikte uitgezet tegen de laagdikte.
Bij de verbranding en activiteitsmeting van de door ons gesynthetiseerde gemerkte steroiden werden de volgende waarden verkregen.

Tabel VIII

	Act. in t/min. gecorr. op standaard-waarde 1400 t/min. en oneindige laagdikte	Totale middelbare statistische fout
cholestenon 3 C^{14}	5203	0,7 %
	5429	0,7 %
cholestenonenolacetaat 3 C^{14}	5312	0,5 %
	5598	0,5 %
cholesterylacetaat 3 C^{14}	5381	0,5 %
	5320	0,5 %
	5490	0,5 %

Bij de activiteitsbepalingen van de $BaCO_3$ praeparaten verkregen door verbranding van de onverzeepbare materie, geisoleerd uit de borstspier van een kip (zie pag. 104, hoofdstuk IV) is tengevolge van de lage activiteit de middelbare statistische fout veel hoger nl. 1-5%.

HOOFDSTUK III

DE EXTINCTIOMETRISCHE BEPALING VAN VITAMINE D[1)]

PAR. 1 INLEIDING

Vitamine D kan zowel direct spectrofotometrisch als, na koppeling met een geschikt reagens, colorimetrisch bepaald worden[83]. Bij de spectrofotometrische bepaling wordt gebruik gemaakt van het absorptiemaximum bij 265 mμ. De methode wordt echter reeds door kleine hoeveelheden verontreinigingen gestoord en kan alleen bij tamelijk zuivere praeparaten worden toegepast. In het bestralingsproduct kan vitamine D op deze wijze niet direct worden bepaald omdat verschillende bijproducten in hetzelfde gebied absorberen als vitamine D (zie tabel III op blz. 45). Wanneer echter het tachysterol door middel van een additiereactie met maleinezuuranhydride verwijderd is, vertoont het bestralingsproduct na chromatografie over Al_2O_3 een absorptiespectrum dat niet veel verschilt van dat van zuiver vitamine D en is het mogelijk met de spectrophotometrische methode een schatting te maken van het vitamine D gehalte. De gevonden waarden zijn meestal ongeveer 10% te hoog Ook voor bepalingen in pharmaceutische praeparaten zoals bijv. oplossingen van vitamine D in olie vindt de spectrofotometrische methode wel toepassing. De olie wordt dan eerst verzeept en het onverzeepbare materiaal geisoleerd. Hierna kan na verwijdering van de meeste onzuiverheden door chromatografische absorptie het vitamine D worden bepaald.

In de literatuur zijn een groot aantal colorimetrische bepalingsmethoden beschreven. Er wordt o.a. gebruik gemaakt van de kleurreacties van vitamine D met $AlCl_3$ en pyrogallol[84] broom en chloroform[85], $SbCl_3$[86], aldehyden[87] en glycerol-dichloorhydrine[88]. De reactie met $SbCl_3$ heeft echter het meest toepassing gevonden. Door H. Brockmann en H. Chen[86] werd gevonden, dat vitamine D_2 en vitamine D_3 met $SbCl_3$ in $CHCl_3$ een oranjegele kleur met een absorptiemaximum bij 500 mμ geven. De kleurintensiteit neemt met de tijd toe en bereikt na ongeveer 1 min. een maximale waarde.

1) Bij de metingen werd gebruik gemaakt van een Beckman Quartz Spectrophotometer model D U en een Coleman Junior Spectrophotometer model 6 A

De reactie is lichtgevoelig, zodat onder afscherming van licht moet worden gewerkt. Volgens Nield, Russel en Zimmerli[89] kan het $SbCl_3$ – $CHCl_3$ reagens aanzienlijk worden gestabiliseerd door 2% acetylchloride toe te voegen. Met dit zg. Nield's reagens worden in de regel goede resultaten verkregen.
Bij de bepaling wordt een bepaalde hoeveelheid van het praeparaat opgelost in chloroform, Nield's reagens toegevoegd en de extinctie bijv. na 1 min. gemeten. Door deze te vergelijken met de extinctie van een op dezelfde wijze behandelde oplossing van een bekende hoeveelheid zuiver kristallijn vitamine D in $CHCl_3$, kan het vitamine gehalte van het praeparaat berekend worden. Het verband tussen de extinctie en de vitamine concentratie is lineair.
In de regel zijn in het te onderzoeken praeparaat allerlei storende stoffen aanwezig, die voor de bepaling eerst verwijderd moeten worden. Steroiden bijv. cholesterol en 7-dehydrocholesterol geven met Nield's reagens ook een kleurreactie. De intensiteit is echter ongeveer 50 maal kleiner dan bij vitamine D. Verder kan de bepaling gestoord worden door vitamine A, vitamine A ester en carotenoiden. Deze verbindingen geven met $SbCl_3$ een blauwe kleur (abs. max. 620 mμ), die de bepaling bij 500 mμ aanzienlijk stoort. Nadat vetten door verzeping of uitvriezen zijn verwijderd, kan volgens P.B. Muller[90] door chromatografie over Al_2O_3 vitamine D van vitamine A ester, carotenoiden en steroiden gescheiden worden. De steroiden kunnen eventueel ook met digitonine worden verwijderd. Een scheiding van vitamine A is echter op deze wijze niet mogelijk, zodat bij aanwezigheid van deze laatste verbinding een correctie in de bij 500 mμ gemeten extinctie moet worden aangebracht, die uit de bij 620 mμ waargenomen extinctie met behulp van een met zuiver vitamine A bepaalde curve kan worden berekend.

PAR. 2 DE COLORIMETRISCHE BEPALING VAN VITAMINE D IN HET BESTRALINGSPRODUCT

Evenals de spectrophotometrische methode wordt ook de colorimetrische bepaling van vitamine D in bestralingsproduct gestoord door de aanwezigheid van tachysterol. Deze laatste verbinding geeft nl. evenals vitamine D met Nield's reagens een intensieve oranjegele kleur, met een absorptiemaximum bij 500 mμ, die eveneens na circa 1 min. een maximale waarde bereikt.
De andere bestralingsproducten geven met het genoemde reagens slechts een zwakke kleuring, zodat zij de bepaling weinig storen Door Windaus en Luttringhaus[91] is aangetoond dat tachysterol

met maleinezuuranhydride of citraconzuuranhydride een additieproduct vormt. Pirlot en Rougir[92] hebben van deze reactie gebruik gemaakt bij de bepaling van vitamine D in bestralingsproduct. Door dit gedurende een half uur op 100° te verhitten met een oplossing van maleinezuuranhydride of citraconzuur anhydride in benzeen wordt alle tachysterol in een additieproduct omgezet. In de aldus verkregen oplossing kan het vitamine D colorimetrisch bepaald worden omdat het additieproduct geen kleurreactie geeft. Volgens Pirlot en Rougir reageert vitamine D niet met maleinezuuranhydride of citraconzuuranhydride. Dit is echter onjuist. Reeds in 1931 is door Windaus en Luttringhaus[91] vastgesteld dat vitamine D langzaam met de genoemde verbindingen reageert. Green[93] heeft aangetoond, dat bij de methode van Pirlot en Rougir ongeveer 30% van het vitamine D verloren gaat.
Door K.H.Hanewald en F.J.Mulder is op het analytisch laboratorium van Philips Roxane te Weesp een methode uitgewerkt, waarmee zeer goede resultaten worden verkregen[1]. Genoemde onderzoekers gebruiken slechts een geringe overmaat maleinezuuranhydride en voeren de condensatie uit bij 75°. Onder deze omstandigheden reageert vitamine D ongeveer 10 maal langzamer met het maleinezuuranhydride dan tachysterol. Het is mogelijk om de vitamine verliezen bij de condensatie in rekening te brengen. Ter verduidelijking geven wij hier het door ons gevolgde voorschrift. Ongeveer 50 mg bestralingsproduct, dat op de bekende wijze met digitonine sterolvrij is gemaakt (zie pag.110) wordt opgelost in 25 ml absolute benzeen. In 4 ampullen wordt 5 ml van deze oplossing gepipetteerd, waarna in iedere ampul 0,3 ml van een 10% oplossing van maleinezuuranhydride in benzeen wordt gebracht. Nadat de lucht boven de oplossingen door CO_2 is vervangen, worden de ampullen afgesloten met een gummislangetje en een klemkraantje en resp. ½, 1, 2 en 3 uur op 75° verhit. Hierna wordt de inhoud overgespoeld in 4 maatkolven van 100 ml en met petroleumaether tot de merkstreep aangevuld. Van ieder van de vier oplossingen wordt 5 ml in vacuum drooggedampt en de resp. residu's opgenomen in 10 ml $CHCl_3$. Voor de colorimetrische bepaling wordt 0,4 ml van de chloroformoplossing in een cuvetje gepipetteerd in het donker, 4 ml Nield's reagens toegevoegd (20 g $SbCl_3$ in 100 ml $CHCl_3$ + 2 ml acetylchloride) en de extinctie bij 500 mμ na 1 min. gemeten. De waargenomen extincties worden uitgezet tegen de tijd. De verkregen grafiek vertoont het in fig.16, pag. 121 aangegeven

1) Hierover zal binnenkort een publicatie verschijnen.

beeld. Gedurende het eerste half uur neemt de extinctie snel af, doordat het maleinezuuranhydride met het tachysterol reageert en het gevormde additieproduct niet met Nield's reagens kleurt. Na 30 min. is vrijwel alle tachysterol verdwenen. De extinctie zal echter langzaam blijven afnemen tengevolge van de reactie tussen het vitamine D en het maleinezuuranhydride. Uit de door extrapolatie gevonden extinctie OA kan het vitamine D gehalte van het praeparaat berekend worden. Voor deze berekening is een ijkwaarde nodig die als volgt wordt verkregen:
25 mg kristallijn vitamine D_2 wordt opgelost in 250 ml petroleumaether. Van deze oplossing wordt 5 ml drooggedampt, en het residu opgenomen in 25 ml $CHCl_3$. Aan 0,4 ml van deze oplossing wordt 4 ml Nield's reagens toegevoegd en de extinctie bij 500 mμ na 1 min. gemeten.
De uitkomsten van de metingen zijn met ongeveer 1% nauwkeurigheid te reproduceren. Gemiddeld wordt ongeveer 15% afwijking van de door dierproeven verkregen waarden gevonden. De oorzaak van deze afwijkingen moet o.i. vooral bij de biologische test worden gezocht. Wanneer we aannemen, dat tachysterol per gewichtseenheid dezelfde kleurintensiteit geeft als vitamine D (dit is niet geheel zeker, omdat tachysterol nog niet in kristallijne vorm is verkregen), is uit OB het tachysterolgehalte te berekenen.
Op blz. 52 van Hoofdstuk I werd beschreven hoe wij uit het bestralingsproduct nog een onbekende stof Y hebben geisoleerd, die met Nield's reagens een kleurreactie geeft. Hierdoor wordt op de hierboven beschreven wijze misschien een enige procenten te hoog vitamine gehalte bepaald.
In het product verkregen door 110 mg provitamine met een gehalte van 91,5% 7-dehydrocholesterol (zie pag. 74) in het semimicroapparaat te bestralen, vonden wij een vitamine D_3 en tachysterol gehalte van resp. 47 en 25%. De in fig. 16, pag. 121 , opgegeven extincties zijn de uitkomsten van deze bepaling.

PAR. 3 BEPALING VAN DE VITAMINE D_3 VERLIEZEN BIJ DE ISOLERING VAN VITAMINE D_3 UIT BESTRALINGSPRODUCT

Zoals in hoofdstuk I blz. 51 werd beschreven hebben wij bij de isolering van vitamine D_3 uit het bestralingsproduct eerst tachysterol door condensatie met maleinezuuranhydride verwijderd, daarna het residu veresterd met 3,5-dinitrobenzoylchloride en gechromatografeerd.
Om na te gaan in welke mate bij de verschillende bewerkingen tijdens de isolering van het vitamine D_3 verliezen optreden ,

hebben wij bij één van de voorproeven, met een door bestraling op grotere schaal verkregen product, na iedere bewerking de intensiteit van de kleurreactie met Nield's reagens bepaald.
In tabel IX geven wij de resultaten van onze metingen weer.

Tabel IX

	Aantal S.E.
Bestralingsproduct	1,315
Bestralingsproduct na behandeling met maleinezuuranhydride	1,074
Vitamine D_3 uit bestr. prod. geisoleerd door chromatografie van het dinitrobenzoaat	0,96
Stof Y	0,128

Wij hebben de kleur verkregen met Nield's reagens uitgedrukt in S.E.[1] *vitamine D*.
Uit fig. 16, pag. 121, volgt, dat door de verhitting van het bestralingsproduct met maleinezuuranhydride gedurende ½ uur ongeveer 8% van het vitamine D_3 verloren gaat. Het bestralingsproduct bevatte dus 1,315 – 1,074 ÷ 0,08 = 0,16 *S.E.* tachysterol (ongeveer 9%).
Uit het met 3,5-dinitrobenzoëzuur veresterde tachysterolvrije product kristalliseerde uit petroleumaether + 8% aether een onbekende stof. Deze zg. stof Y gaf met Nield's reagens een kleuring, die overeenkwam met 0,128 S.E. vitamine D_3. Wanneer we dit bedrag optellen bij de 0,96 S.E. vitamine D_3, die uiteindelijk uit het bestralingsproduct werden geisoleerd, dan vinden wij 1,088 S.E. Deze uitkomst stemt binnen de experimentele fout overeen met de 1.074 S.E., die voor de verestering met 3,5-dinitrobenzoylchloride aanwezig waren. Na de afscheiding van de stof Y treden dus bij de chromatografische zuivering geen vitamineverliezen meer op.

1) I.S.E. = 25 mg vitamine D

PAR. 4 VITAMINE D BEPALING IN HET ONVERZEEPBARE MATERIAAL, GEISOLEERD UIT DE BORSTSPIER VAN EEN KUIKEN

In hoofdstuk IV wordt beschreven, hoe wij kuikens in de borstspier hebben ingespoten met een olieoplossing van vitamine D_3 en op verschillende tijden na de injectie de nog in de spier aanwezige hoeveelheid vitamine D_3 hebben bepaald. Hiertoe werd de spier opgelost in methylalcoholische KOH en het onverzeepbare materiaal geisoleerd. Hierin werd colorimetrisch het vitamine D_3 bepaald. Deze bepaling was mogelijk, omdat de spier vrijwel geen vitamine A bevatte. Carotenen en andere storende stoffen konden door chromatografie over Al_2O_3 worden verwijderd. Steroiden werden met digitonine neergeslagen.

Voor een nadere beschrijving van de proeven verwijzen wij naar hoofdstuk IV.

HOOFDSTUK IV

ONDERZOEKINGEN OVER HET DOOR INTRAMUSCULAIRE INJECTIE GEVORMDE DEPOT VAN VITAMINE D_3

PAR. 1 INLEIDING

We willen beginnen met enkele gegevens en gedachten uit de literatuur naar voren te halen, die weliswaar min of meer op zichzelf staan en weinig samenhang vertonen, maar die toch aanwijzingen vormen om het vraagstuk van de depotvorming bij intramusculaire injectie van vitamine D quantitatief te gaan bestuderen.

Reeds in 1928 is Volmer[94] erin geslaagd rhachitis bij ratten door toediening van een enkele, grote dosis vitamine D te genezen. De giftigheid van de toen beschikbare bestralingsproducten van ergosterol is destijds de belemmering geweest om de zg. stoot-behandeling toe te passen. Omstreeks 1932 zijn evenwel praeparaten van zuiver vitamine D op voldoende schaal verkrijgbaar gesteld en enige jaren later heeft, zowel voor de prophylaxe als voor de therapie van rhachitis en tetanie, de behandeling met een of enkele grote doses vitamine D ingang gevonden. Een lijder aan Engelse ziekte kan, door hem eenmaal een dosis van 7,5 - 15 mg vitamine D opgelost in olie toe te dienen, in korte tijd worden genezen[95]. Voor de rhachitis-prophylaxe is in de regel een dosis van 7,5 mg (300 000 internationale eenheden) voldoende. Het individu is dan gewoonlijk gedurende de 4 - 7 daarop volgende maanden voor rhachitis gevrijwaard.

Door verschillende onderzoekingen is het komen vast te staan, dat het dierlijk organisme in staat is om het vitamine D in verschillende organen op te slaan. Heymann[96] heeft uit organen van konijnen, welke hij 200 000 internationale eenheden vitamine D_2 oraal had toegediend, de onverzeepbare materie geisoleerd en daarin door middel van proeven op ratten het gehalte aan vitamine D_2 bepaald. Een week na de toediening van het vitamine bleek dit nog vrijwel overal in het lichaam aanwezig te zijn. Heymann heeft nagegaan, hoe lang het vitamine D_2 in bloed en organen aantoonbaar bleef en daarbij gevonden, dat dit in de hersenen 1 - 2 weken het geval was; in huid, longen en nieren kon het na 5 - 8 weken, in dunne en dikke darm nog na 8 - 12 weken worden aangetoond. Terwijl in de rode bloedcellen 6 weken lang

antirhachitisch actieve stof werd aangetroffen, was dit in het bloedplasma meer dan 3 maanden het geval.
Het feit, dat vitamine D zo lang in het bloedplasma aanwezig bleek te zijn, is volgens Heymann in overeenstemming met hetgeen het langdurig effect van een stootdosis doet verwachten.
Reeds eerder hadden Coppens en Metz[97] bij honden nagegaan, in welke organen het vitamine D na orale toediening van een hoeveelheid bestraald ergosterol terechtkomt. Tien uur na de opname hebben deze onderzoekers met behulp van proeven op rhachitische ratten, het vitamine D in de lever, de bijnieren, de milt, het bloed, het mesenterium en soms ook in de nieren kunnen aantonen. In het hart, de hersenen en de pancreas hebben zij het niet aangetroffen.
Houet[98] heeft na het overlijden bij een kind, dat 48 uur te voren 15 mg (600.000 internationale eenheden) vitamine D had toegediend gekregen, in de lever 1600 internationale eenheden, in de nieren 25.600 internationale eenheden en in de hersenen 64.000 internationale eenheden teruggevonden. In het hart, de longen en de spieren bleek vrijwel geen vitamine D aanwezig te zijn. Het is aannemelijk, dat ook in de huid en het subcutane bindweefsel vitamine D wordt opgeslagen.

Voor de mate en de duur van de antirhachitische werking is het niet onverschillig, of het vitamine D bij de stootbehandeling oraal dan wel intramusculair is toegediend.
Jesserer[99] heeft beschreven, dat indien 15 mg vitamine D_2 of D_3 in eenmaal oraal is gegeven, de storingen in de mineraalstof-wisseling, welke de oorzaak zijn van rhachitische tetanie, binnen enkele dagen worden opgeheven. Daarentegen is hem gebleken, dat de hypocalcaemie na intramusculaire injectie van eenzelfde dosis vitamine D_2 langer blijft bestaan.
Intramusculair ingespoten vitamine D_3 doet de bedreiging door latente of manifeste tetanie langer bestaan dan oraal opgenomen vitamine D_2, doch aanzienlijk korter dan intramusculair toegediend vitamine D_2. Jesserer meent dus, dat om de verstoring in de mineraal-stofwisseling, welke tetanie veroorzaakt, zo snel mogelijk op te heffen, men het vitamine D het beste kan ingeven. Hij beveelt de parenterale toediening van het vitamine D als de meest geschikte prophylactische methode, dus voor niet-rhachitische kinderen, aan.
Gounelle, Teulon en Paulais[100] hebben in proeven met ratten en honden kunnen waarnemen, dat herhaalde toediening per os van grote doses calciferol in olie opgelost, spoedig tot vergiftigings-

verschijnselen, nl. hypercalcaemie en kalkafzetting in nieren, longen en maag, leidt. Indien het calciferol in gelijke doses intramusculair was toegediend, hebben deze onderzoekers weinig van de verschijnselen van intoxicatie kunnen bespeuren Voor dit opmerkelijke verschil hebben zij twee verklaringen mogelijk geacht Door het contact met het spierweefsel zou het vitamine D vernietigd of veranderd kunnen worden Als tweede mogelijkheid is te noemen een tragere resorptie van het in olie opgeloste vitamine D uit het depot in de spier, waardoor de werking over een langere periode uitgebreid wordt doch minder intensief is Om de laatstgenoemde veronderstelling nader aan het experiment te toetsen, hebben de genoemde onderzoekers een hydrosol van calciferol (0,2 ml, waarin 2 mg calciferol) bij ratten intramusculair ingespoten.Het toxisch effect van dit praeparaat waarvan een snelle resorptie kan worden aangenomen bleek zelfs sterker te zijn dan na de orale toediening van calciferol in olie Zij hebben uit hun proeven geconcludeerd, dat inderdaad de resorptie van vitamine D uit een intramusculair depot door tegelijkertijd daarin aanwezige olie wordt vertraagd

Teneinde het prophylactisch en therapeutisch effect van oraal toegediend vitamine D met dat van intramusculair ingespoten vitamine D te kunnen vergelijken, hebben van Niekerk en Bliek[1c] proeven met kuikens genomen Zij hebben daarbij gebruik gemaakt van vitamine D_3, omdat vitamine D_2 bij deze dieren slechts in zeer geringe mate werkzaam is

Een aantal kuikens kreeg vanaf de eerste levensdag een rhachitogeen dieet. Op de 10de dag werden bij groepen kuikens door middel van een sonde verschillende hoeveelheden vitamine D_3 opgelost in arachisolie in de maag gebracht Bij andere groepen werden de vitamine-oplossingen van verschillende sterkten intramusculair, in de musculus pectoralis, gespoten Het proces van de beenvorming werd nu voor ieder kuiken regelmatig gecontroleerd met behulp van Rontgenfoto's, welke van de articulatio intertarsea van een der poten werden gemaakt De resultaten waren als volgt

Alleen bij intramusculaire injectie van 20.000 eenheden waren de dieren gedurende de gehele waarnemingstijd (18½ week) beschermd tegen rhachitis Wanneer 20.000 I E. per os werden toegediend waren de kuikens na enige weken wel genezen, maar begonnen na 7½ week weer rhachitische verschijnselen aan de beenderen te vertonen Wanneer minder dan 20 000 I.E. werden toegediend, was de bescherming tegen rhachitis onvoldoende. Even

grote intramusculair toegediende doses hadden echter een aanzienlijk groter en langer aanhoudend effect dan de oraal gegeven doses.
Kuikens, die gevoederd werden met een rhachitogeen dieet waaraan 150 I.E. vitamine D_3 per 100 g waren toegevoegd, bleven beschermd tegen rhachitis. Wanneer echter geen vitamine D meer in het voeder werd gemengd, bleek de verkalking van de beenderen al spoedig onvoldoende te zijn geworden. De kuikens zijn dus blijkbaar niet in staat geweest van de genoemde hoeveelheid vitamine D_3 in het voedsel geboden, een depot van enige betekenis te vormen.
In een latere publicatie[102] hebben de auteurs mededeling gedaan over de genezing van 4 weken oude, rhachitische kuikens, welke behandeld werden met één, hetzij per os of intramusculair toegediende, grote dosis vitamine D. Het is gebleken, dat de periode nodig voor de genezing (ongeveer 2½ week) noch van de hoeveelheid – mits deze voldoende is – noch van de wijze van toediening invloed ondervindt. Indien het antirhachitische vitamine intramusculair wordt ingespoten, is evenwel een veel kleinere dosis (ca 15.000 internationale eenheden) voldoende om later, nadat genezing is ingetreden, het ontstaan van rhachitische beenafwijkingen te voorkomen. Bij toediening per os waren zelfs 120.000 I.E. daartoe niet voldoende.

Ter verklaring van het aanzienlijk korter durende effect na de toediening via maag en darmkanaal moet volgens Van Niekerk en Bliek in de eerste plaats gedacht worden aan een gebrekkige resorptie. Verder zou het kuiken minder goed in staat kunnen zijn om per os toegediend vitamine vast te houden. Intramusculair ingespoten, in olie opgelost vitamine D, zou slechts langzaam uit het depot in de spier worden geresorbeerd, zodat het kuiken daarvan lange tijd zou kunnen profiteren. Ook de hierboven genoemde resultaten van klinische onderzoekingen wijzen in dezelfde richting. Deze gegevens leken ons zo belangrijk en de ermede samenhangende vraagstukken zo interessant, dat wij een quantitatief onderzoek hebben ingesteld.

PAR. 2 EIGEN ONDERZOEK

Door eigen onderzoek hebben wij nauwkeurige gegevens trachten te verkrijgen over de snelheid, waarmede vitamine D in olie opgelost, uit een door injectie van die oplossing in een spier gevormd depot, verdwijnt. Daarbij hebben wij het moderne hulpmiddel, een

met een isotoop gemerkt praeparaat, gebruikt door in een deel van onze proeven radioactief vitamine D_3 toe te passen. Daarnaast zijn onderzoekingen gedaan, waarin het vitamine D_3 colorimetrisch is bepaald. Onze experimenten konden met kuikens uitgevoerd worden, aangezien deze goed op vitamine D_3 reageren.

Voorbereiding der proefdieren

Met de bedoeling om over rhachitische kuikens te kunnen beschikken, kreeg een groep van 50 kuikens (steeds zijn Noord Hollandse Blauwen gebruikt) vanaf hun eerste levensdag een rhachitogeen dieet van de volgende samenstelling 59% gemalen mais, 25% gemalen tarwe, 12% caseine, 2% geslibd krijt, 1% keukenzout en 1% gedroogde, onuitgetrokken biergist. Daarnaast is een tweede groep, eveneens van 50 kuikens, opgefokt op hetzelfde dieet, waarin echter bovendien 180 internationale eenheden vitamine D_3 per 100 g voer waren gemengd.

Na 3 weken vertoonden de kuikens uit de eerstgenoemde groep reeds ernstige afwijkingen, nl. abnormale stand van de poten ruwe bevedering, matige groei en geringe voedselopname. Inmiddels waren er reeds enige gestorven. De dieren van de tweede groep daarentegen waren alle normaal. Zij hadden zich aanmerkelijk beter ontwikkeld dan de kuikens uit de eerste groep, zij het ook in geringere mate dan kuikens, die op een meer compleet voeder worden opgefokt. 33 Dagen na het begin van de voorbereiding is van alle dieren een Rontgenfoto van het hakgewricht (articulatio intertarsea) gemaakt.

Bij de dieren uit de eerste groep bleken volgens deze foto's zonder uitzondering rhachitische beenafwijkingen te bestaan. Tussen epiphysen en diaphysen vertoonden de Röntgenfoto's grote hiaten, d.w.z. onverkalkt beenweefsel. De dieren, welke vitamine D_3 in het voeder kregen, vertoonden volgens de foto's geen van alle dergelijke afwijkingen (vergelijk de figuren 17 a en b op pag. 121)

Experimentele gegevens

Op dezelfde dag, waarop de toestand van het beenderenstelsel van de kuikens op de Rontgenfoto's is vastgesteld, zijn bij 15 rhachitische kuikens en bij 15 niet-rhachitische kuikens 20.000 internationale eenheden vitamine D_3 3 C^{14}, opgelost in 0,25 ml arachisolie in de rechter borstspier ingespoten. Daarnaast

hebben 18 rhachitische en 19 niet rhachitische kuikens op dezelfde wijze 20.000 internationale eenheden niet gemerkt vitamine D_3 in 0,25 ml arichisolie per injectie toegediend gekregen.
De overige dieren, welke op rhachitogeen dieet of op dat dieet met vitamine D_3 waren voorbereid, zijn aangehouden om als vergelijkingsobject te kunnen dienen.
Alle kuikens is onveranderd het voeder verstrekt, waarvan bij de bespreking van de voorbereiding van de dieren de samenstelling is vermeld.

Enige dagen na geinjiceerd te zijn begonnen alle rhachitische kuikens tekenen van herstel te vertonen. Na een maand waren vrijwel alle oorspronkelijk zieke dieren genezen. Op de Rontgen ogrammen van de hakgewrichten was te constateren, dat in het beenweefsel van de pathologisch verbrede metaphysen zich inmiddels kalkzouten hadden afgezet en de groei der beenderen verder normaal was verlopen (zie fig. 17 c, pag. 121)

Van de rhachitische kuikens, niet ingespoten met vitamine D_3, waren er nog slechts 3 in leven. Op de Rontgenfoto's van hun poten gemaakt, konden zeer ernstige rhachitische beenafwijkingen worden waargenomen. Deze dieren zijn enige weken later te gronde gegaan (zie fig. 17 d, e en f, pag. 121)
Het door ons gesynthetiseerde radioactieve vitamine D_3 praeparaat bleek dus onder de gegeven proefomstandigheden even werkzaam als kristallijn vitamine D_3.

Het tweede gedeelte van het uitgevoerde biologische onderzoek omvat het bepalen van de snelheid, waarmede het vitamine D_3 verdwijnt uit een door inspuiting van een oplossing ervan in olie in de borstspier bij kuikens aangelegd depot.
Daartoe hebben we van de kuikens, welke op de hierboven beschreven wijze vitamine D_3 of vitamine D_3 3 C^{14} toegediend hadden gekregen, er een verschillend aantal dagen na de injectie telkens één afgemaakt, de borstspier uitgepraepareerd en hierin de hoeveelheid nog aanwezig vitamine D_3 of radioactief materiaal bepaald. Dit geschiedde door de spier op te lossen in methylalcoholische KOH en het onverzeepbare materiaal (O.M.) te isoleren (zie beschrijving van de gevolgde werkwijzen.

Resultaten der bepalingen
Een deel van het onverzeepbare materiaal (ongeveer 5 mg),

afkomstig van de kuikens, die met vitamine D_3 3 C^{14} waren ingespoten, werd tot CO_2 verbrand met het chroomzuur mengsel van Van Slijke-Folch (zie hoofdstuk II). Het koolzuur werd opgevangen in barietwater en de radioactiviteit van een *oneindig* dikke laag $BaCO_3$ gemeten.
Om uit de aldus verkregen waarde het percentage te berekenen van het ingespoten radioactieve materiaal, dat op een gegeven ogenblik (de dag van het slachten) nog in de spier aanwezig was, moet met de volgende factoren rekening worden gehouden.
De op de hierboven beschreven wijze bepaalde activiteit is niet alleen afhankelijk van de hoeveelheid radioactief materiaal, die op de slachtdatum nog in de spier aanwezig was, maar ook van de verdunning door de onverzeepbare materie van de spier. Verder is het niet uitgesloten, dat bij de intramusculaire injectie een klein gedeelte van de olie-oplossing niet in de spier maar bijv. onder de huid is terechtgekomen.

Bovengenoemde factoren hebben wij op de volgende wijze in rekening gebracht:
Een borstspier van 43 g van een niet ingespoten kuiken werd met 0,4775 g van de voor de injectie gebruikte olie-oplossing van vitamine D_3 3 C^{14} verzeept. Er werd 48,5 mg onverzeepbaar materiaal geisoleerd. Een gedeelte hiervan werd verbrand en de activiteit gemeten in een *oneindig* dikke laag $BaCO_3$. Deze bedroeg 196 tikken/min. Wanneer in plaats van 0,4775 g olie-oplossing 0,25 ml (= 0,23 g = de geinjiceerde hoeveelheid) was gebruikt dan zou de activiteit 94,4 tikken/min. bedragen hebben. Wanneer niet 48,5 mg doch 20 mg o.m. in de spier aanwezig was geweest dan zou de activiteit 229 tikken/min. geweest zijn.
Wij hebben nu steeds de activiteit van de *oneindig* dikke $BaCO_3$ plaatjes verkregen door de verbranding van de o.m. geisoleerd uit de borstspier van de met 0,25 ml vitamine D_3 3 C^{14} oplossing ingespoten kuikens omgerekend op 20 mg o.m. Door de aldus verkregen activiteitswaarden te delen door 2,29 kon het percentage van het ingespoten materiaal dat nog in de spier aanwezig was, berekend worden.

Tabel X geeft de resultaten weer van de onderzoekingen bij kuikens, die werden gevoederd met het genoemde rhachitogene mengsel waaraan per 100 g 180 I.E. vitamine D_3 was toegevoegd.
Bij de kuikens uit tabel XI werd de toevoeging van vitamine D_3 aan het voeder achterwege gelaten.

Tabel X

Aantal dagen na injectie	Gew. Kip in g op slachtdatum	Gew. spier in g	Gew. o.m. in mg	Dig. sterol in mg	Activ. in t/min. $BaCO_3$	Activ. ber. op 20 mg o.m.	% aanwezig radioact. materiaal	Vit. D bep. in I.E.
1	285	11,5	18,9	-	187,7	177	77,3	
5	300	12,3	21	-	177	186	81,2	
12	300	13,3	23,8	-	137,6	164	71,6	
27	760	35	39,5	26	225(ns)	152	66,4	
33	716	32,5	34	-	83,8	142	62,2	
54	1450	69,3	71,2	-	29,5	105	45,8	
74	1365	77	64	-	30,3	97	42,3	
109	2030	94	73,4	56,7	25,4	93	40,7	8140 (40,7%)
145	2415	140	86,6	69,1	14,1	61	26,7	5210 (26 %)
195	2435	148	104,4	86,5	3,5	18	8	1744 (8,7 %)

Tabel XI

Aantal dagen na injectie	Gew. Kip in g op slachtdatum	Gew. spier in g	Gew. o.m. in mg	Dig. sterol in mg	Activ. t/m. op $BaCO_3$	Activ. ber. op 20 mg o.m.	% aanwezig radioact. materiaal	Vit. D bep. in I.E.
1	223	6,7	19		186,1	177	77,3	
5	188	6,8	11,5		34,6	199	87	
12	250	8,8	18,6		191	178	77,5	
20	312	12,2	26,7		124,7	166	72,7	
33	626	31,7	39,2		76,8	151	66	
54	1115	53	53		42,5	113	49,3	
74	1275	73	80,2		28,4	114	50	
109	2050	123	86,3	68,4	18,2	79	34,3	7630 (38,1%)
145	1875	130	92,4	68,8	6,7[1)]	31	13,3	8366 (41 %)
195	2400	160	105,8	74,6	2,9	15	6,7	2420 (12,1%)

1) onjuiste bepaling

In fig. 18, pag. 121. zijn de gegevens in de beide tabellen samengevat. De geleidelijke afname van het in de spier aanwezige radioactieve materiaal is daaruit zeer duidelijk af te lezen. Dat het radioactieve materiaal voor het grootste deel uit vitamine D_3 3 C^{14} bestaat en niet door contact met de spier in andere verbindingen is omgezet, wordt waarschijnlijk door de volgende onderzoekingen.

Bij kuikens, die met gewoon vitamine D_3 waren ingespoten, hebben wij in het onverzeepbare materiaal langs colorimetrische weg het vitamine D_3 bepaald. Cholesterol en andere sterolen werden hiertoe eerst door praecipitatie met digitonine verwijderd, omdat deze verbindingen de colorimetrische vitamine D-bepaling met Nield's reagens storen (zie hoofdstuk III).

Wij hebben daarbij gevonden, dat het onverzeepbare materiaal voor ongeveer 70% uit met digitonine praecipiteerbare sterolen bestond (zie tabel I en II). Behalve voor deze sterolen waren echter ook nog andere storende stoffen aanwezig, zoals bijv. carotenoiden, die ook met Nield's reagens kleuren. Het is ons gelukt een groot gedeelte van deze verbindingen door chromatografie van het vitamine D_3 te scheiden.

Wanneer onverzeepbaar materiaal geisoleerd uit een borstspier van een niet met vitamine D oplossing ingespoten kip, werd behandeld met Nield's reagens, dan ontstond na 1 min. een kleuring, die overeenkwam met 2750 I.E. vitamine D_3. Na 3 min. kwam de kleur overeen met 6720 I.E. vitamine D_3. Dit oplopen van de extinctie wijst op de aanwezigheid van andere stoffen dan vitamine D_3. Deze laatste stof geeft nl. reeds na 1 min. de maximale kleuring, terwijl bijv. met cholesterol pas na 3 min. dit maximum bereikt wordt. Na verwijdering van de storende sterolen door praecipitatie met digitonine werd na 1 min. een extinctie gevonden, die overeenkwam met 710 I.E. vitamine D_3.

Wanneer het sterol vrije product werd gechromatografeerd, gaf de fractie, die het vitamine D zou moeten bevatten een kleuring, die overeenkwam met 300 I.E. vitamine D. Bij onderzoek van het u.v. absorptiespectrum kon echter geen vitamine D worden aangetoond. De kleuring moet dus aan nog aanwezige verontreinigingen worden toegeschreven. Een blanco waarde van 300 I.E. is echter zeer laag te noemen, zodat een vitamine-bepaling in de onverzeepbare materie van de spier volgens de gevolgde werkwijze voor het gestelde doel voldoende nauwkeurig mag worden geacht.

Om na te gaan in welke mate bij de verschillende bewerkingen (verzeping, behandeling met digitonine, enz.) verliezen aan

vitamine optreden, hebben wij een spier samen met 0,25 ml arachisolie, waarin 20.000 internationale eenheden vitamine D_3 was opgelost, verzeept. Bij de bepaling van het vitamine D in het geisoleerde onverzeepbare materiaal werden 19.200 internationale eenheden teruggevonden. Het vitamine D_3 kwam bij de chromatografie in de juiste fractie terecht en de kleuring met Nield's reagens bereikte na 1 min. de maximale waarde.
Geringe oxydatie van het vitamine D_3 tijdens de verschillende bewerkingen mag echter niet worden uitgesloten. Door deze omstandigheid wordt de colorimetrische bepaling onnauwkeuriger dan de radiometrische. Bij de chromatografie, welke voor de colorimetrische bepaling wordt toegepast, komen nl. oxydatieproducten niet in de vitamine D_3 fractie terecht. Dit is bij vitamine D_3 bepaling in zeer oude praeparaten gebleken. Verder werden bij enige colorimetrische bepalingen te hoge waarden gevonden, doordat vetzuren (vooral onverzadigde) niet volledig uit het onverzeepbare materiaal waren verwijderd.

Op de hierboven beschreven wijze hebben wij op verschillende tijdstippen na de injectie de nog in de borstspier aanwezige hoeveelheid vitamine D_3 bepaald. De resultaten kwamen ongeveer overeen met de bij de proeven met vitamine D_3 3 C^{14} verkregen uitkomsten, doch deze laatste achten wij meer betrouwbaar. Wij hebben nl. kunnen vaststellen, dat tijdens de verzeping geen radioactief materiaal verloren gaat. Wij hebben daarom het onderzoek langs colorimetrische weg van het depot in de borstspier van de met vitamine D_3 ingespoten kuikens gestaakt. Met het onverzeepbare materiaal van een aantal met vitamine D_3 3 C^{14} ingespoten dieren is evenwel naast een bepaling van de hoeveelheid nog in de spier aanwezig radioactief materiaal, ook een colorimetrische vitamine D_3 bepaling uitgevoerd.
In de laatste kolom van de tabellen X en XI worden de uitkomsten van deze metingen opgegeven. Zij bleken vrij goed overeen te stemmen met de door meting van de radioactiviteit verkregen waarden. Het wordt hierdoor waarschijnlijk, dat het onverzeepbare materiaal, dat uit de spier werd geisoleerd, vitamine D_3 3 C^{14} als voornaamste radioactieve bestanddeel bevat.
Dit is bevestigd door een rattenproef, waaruit bleek, dat onverzeepbaar materiaal 1½ maand na de injectie van vitamine D_3 uit de borstspier geisoleerd nog anti-rhachitisch actief was.
Tenslotte werden 7 maanden na de injectie Röntgenfoto's gemaakt van het hakgewricht van de ingespoten kuikens. Er kon geen

ontkalking worden waargenomen. De dieren hebben dus gedurende de gehele proefperiode van het vitamine D depot kunnen profiteren en geen vitamine D gebrek gehad.
Over de nauwkeurigheid van onze proeven kunnen wij nog het volgende opmerken:
Hoewel de injecties zo nauwkeurig mogelijk werden toegediend, mag een fout van enige procenten niet uitgesloten geacht worden. De fout in de colorimetrische vitamine D_3 bepaling zal bij hoeveelheden van ± -20.000 I.E. ongeveer 5 - 10% bedragen. Bij de bepaling van kleinere hoeveelheden, bijv. 1000 internationale eenheden, zal echter de fout mogelijk veel groter zijn. De fout van de radiometrische methode is waarschijnlijk kleiner dan van de colorimetrische methode.

Samenvatting en discussie
Uit de verkregen gegevens kan besloten worden, dat wanneer een grote dosis vitamine D_3, in olie opgelost, in een spier bij kuikens wordt ingespoten er een depot wordt gevormd, waaruit de dieren voldoende antirhachitisch vitamine kunnen putten om niet alleen een floride rhachitis te genezen, doch ook een bescherming tegen het ontstaan van deze ziekte te verlenen, gedurende tenminste 7 maanden, ondanks het feit, dat zij een voedsel hebben gekregen, waarop zich in ernstige mate rhachitis zou hebben ontwikkeld. De quantitatieve metingen leren dat het depot geleidelijk kleiner wordt en na 7 maanden tot ongeveer 10% van de oorspronkelijke waarde is teruggelopen.

Over de wijze, waarop het vitamine D geleidelijk aan uit de spier wordt geresorbeerd, kunnen wij ons voorstellen, dat het vitamine D gelijktijdig met de olie uit de spier verdwijnt. Met Röntgen-opnamen is het aangetoond, dat lipiodololie, d.i. gejodeerde maanzaadolie, die door 't hoge jodiumgehalte ondoordringbaar is voor Röntgenstralen, na de intramusculaire injectie geleidelijk tussen de spiervezels dringt en maanden lang in de spier aanwezig blijft. Op Röntgenfoto's is de olie, zeker de eerste dagen na de injectie, goed waarneembaar. Om de zo juist genoemde veronderstelling over het verdwijnen van het vitamine D uit het depot enigermate aan de werkelijkheid te toetsen, hebben wij van enige kuikens, die tevoren waren ingespoten, niet alleen het vitamine-gehalte, doch ook het vetgehalte in de borstspier bepaald. Daarbij hebben wij de indruk gekregen dat er een paralleliteit tussen het vetgehalte en het vitamine D gehalte bestaat. Daardoor

zou aan onze voorstelling over het verdwijnen van het vitamine D depot enige steun worden verleend.

Het is verwonderlijk, dat blijkbaar het vitamine D_3 bij een temperatuur van ruim 37^{o}, in de spier zolang onaangetast blijft. Misschien wordt het door de vorming van een molecuulverbinding met een lipoid of cholesterol gestabiliseerd. Het is nl. bekend, dat de dubbelverbinding van vitamine D_3 en cholesterol veel stabieler is dan het zelfstandige vitamine D_3 en lange tijd zonder veranderingen te ondergaan, aan de lucht bij kamertemperatuur kan worden bewaard.

Behalve de oplossing van dit vraagstuk zou ook een onderzoek naar de vorm, waarin het vitamine D in het bloedplasma voorkomt, zeer belangwekkend zijn. Ook in het laatste geval is een stabilisatie door de vorming van genoemde dubbelverbinding zeer wel mogelijk te achten. Uiteindelijk zal men natuurlijk wensen na te gaan waar het vitamine D heen wordt gevoerd en waar precies het zijn antirhachitische werking uitoefent.

PAR. 3 BESCHRIJVING VAN DE GEVOLGDE WERKWIJZEN

1 Isolering van onverzeepbaar materiaal uit de borstspieren der kuikens

De uitgepraepareerde spier werd in stukjes verdeeld en in een kolf met terugvloeikoeler gebracht. Na toevoeging van 20% methylalcoholische kaliloog, ongeveer 100 ml per 20 g spier, werd gedurende 40 min. in een stikstofatmosfeer gekookt. Hierna werd aan het mengsel per 100 ml 300 ml water toegevoegd. De aldus verkregen alkalische oplossing werd 5 maal met aether geextraheerd. De verzamelde aetherische extracten werden met water gewassen, waarbij eerst enige malen water door de aetherlaag werd gegoten om emulsies te vermijden en daarna nog met 0,5 N KOH en water. Door deze wassingen worden in de aetherlaag aanwezige vetzuren verwijderd. Nadat de aether in vacuum bij 30^{o} onder stikstof was afgedestilleerd werd het residu gedroogd door toevoegen en weer afdestilleren van een mengsel van absolute alcohol- absolute benzeen 1:1 en benzeen.
De onverzeepbare materie werd met absolute benzeen overgespoeld in een van te voren gewogen kolfje, de benzeen afgedestilleerd, het residu gedroogd in hoogvacuum en het kolfje weer gewogen.

2 Bepalingen van de radioactiviteit van de onverzeepbare materie
Het onverzeepbare materiaal werd opgelost in een bekende hoeveelheid, bijv. 5 ml. petroleumaether. Kp 40 - 60°. Van deze oplossing werd een gedeelte overgebracht in een van te voren gewogen glazen cuvetje. De petroleumaether werd verwijderd door het cuvetje in een vacuum exsiccator te plaatsen, zacht te zuigen en via een capillair voorzichtig een stroom droge stikstof over het praeparaat te leiden. De laatste sporen oplosmiddel werden in hoogvacuum verwijderd. Er werd voor gezorgd, dat het gewicht van het residu ongeveer 5 - 10 mg bedroeg. Het cuvetje met onverzeepbare materie werd nu in de buis A van het in hoofdstuk II beschreven verbrandingsapparaat gebracht. de verbranding op de daar aangegeven wijze uitgevoerd en de activiteit van het $BaCO_3$ gemeten.

3 Bepaling van vitamine D_3 in het onverzeepbare materiaal
De onverzeepbare materie werd opgelost in alcohol. waartoe per 20 mg 13 ml alcohol werd gebruikt. De oplossing werd in een stikstofatmosfeer tot bijna koken verhit en een eveneens bijna kokende oplossing van 100 mg digitonine in 12,5 ml alcohol + 1,75 ml H_2O toegevoegd. Wanneer meer dan 20 mg onverzeepbare materie aanwezig was, werden de hoeveelheden in dit en het volgende voorschrift evenredig verhoogd. Na een nacht staan onder N_2 werd het digitonide afgefiltreerd in een glazen filterkroesje, dat gedurende ½ uur op 80° was gedroogd. Het digitonide werd 2 maal gewassen met 2.5 ml oplossing van Caminade (75 ml aceton + 9 ml alcohol + 18 ml gedestilleerd H_2O) en 2 maal met 15 ml aether. Het kroesje met digitonide werd ½ uur gedroogd op 80° en gewogen. Het filtraat met de wasvloeistoffen werd nu met 40 ml aether in een scheitrechter gebracht en geschud met 30 ml verzadigde NaCl oplossing en 30 ml H_2O. De waterlaag werd 1 maal met 40 ml aether en 3 maal met 25 ml aether geextraheerd. De verzamelde aetheroplossingen werden goed met water gewassen, waarbij eerst zonder schudden water door de oplossing werd gegoten, om emulsievorming te voorkomen. Na afdestilleren van de aether werd het residu door toevoegen en weer afdestilleren van een mengsel van absolute alcohol-absolute benzeen en benzeen gedroogd. Het residu werd opgelost in 10 ml zuivere petroleumaether en gechromatografeerd over 10 g Al_2O_3 (sterkte III volgens Brockmann, verkregen door 100 g Al_2O_3 van Merck te schudden met 2,5 ml H_2O). Als eerste fractie werd opgevangen het filtraat en nog 25 ml petroleumaethereluaat. In de tweede fractie werd met

75 ml petroleumaether + 8% aether een spoor van een geelgekleurde stof geelueerd. Met 50 ml petroleumaether + 40% aether werd het vitamine D geelueerd. Boven in de kolom bleef een gele band achter. De derde fractie werd drooggedampt en het residu opgenomen in 10 ml $CHCl_3$. Van deze oplossing werd 0,2 ml gepipetteerd in een cuvet van de colorimeter (Coleman) en 2 ml Nield's reagens (zie pag. 94). toegevoegd. Na 1 min. werd de extinctie bij 500 mμ gemeten en hieruit met behulp van een ijkwaarde de aanwezige vitamine D hoeveelheid berekend (zie hoofdstuk III).

SUMMARY

Using $BaC^{14}O_3$ (Oak Ridge) as starting material we synthesized vitamin D_3 3 C^{14} via Δ 4 cholestenone 3 C^{14}, cholesterylacetate 3 C^{14} and 7-dehydrocholesterol 3 C^{14}. Δ 4 Cholestenone 3 C^{14} was prepared according to a method described by Turner[1] in 1947. The results obtained by the said author, could be reproduced without important alterations. In 1946 Reich and Lardon[3] described a method for the conversion of Δ 4 cholestenone into cholesterol which goes in 6 steps. In repeating this procedure with inactive material we obtained a total yield of 27%. It appeared that the various reactions could be carried out on a small scale with radio active material and in this way we succeeded in preparing cholesterylacetate 3 C^{14} from Δ 4 cholestenone 3 C^{14}. From the latter compound 7 dehydrocholesterol 3 C^{14} was synthesized by brominating with bromosuccinimide, followed by removal of hydrobromic acid with collidine as described by Keverling Buisman Stevens and Van der Vliet[37]. By irradiating this pro-vitamine D_3 3 C^{14} with U.V. light a product was formed consisting of vitamin D_3 3 C^{14} for about 50% The tachysterol was removed by means of the addition reaction with maleic acid anhydride. Chromatographing the irradiated mixture that had been esterified by means of 3,5 dinitrobenzoylchloride, gave a product consisting of vitamin D_3 3 C^{14} for about 80%.

Our synthesis of the cholesterylacetate 3 C^{14} having attained an advanced stage, some publications[4 5 6 7 8] appeared which mentioned shorter methods for the conversion of Δ 4 cholestenone into cholesterol. Here the starting material always is cholestenonenol-acetate which can be prepared from Δ 4 cholestenone in good yield. By reduction of cholestenonenolacetate with $LiAlH_4$ or $NaBH_4$ cholesterol can be obtained together with a number of byproducts. Cholestenonenolacetate can also be converted with KNH_2 in liquid ammonia into Δ 5 cholestenone[8]. This compound can be reduced with $LiAlH_4$ into cholesterol.

Some of the reactions were studied by us and some speculations about their possible mechanisms were made.

From a number of biological and medical publications[98-102] it seems possible that vitamin D_3 dissolved in oil and intramuscu-

larly injected, disappears only slowly out of the muscle concerned. With the vitamin D_3 3 C^{*4} prepared we investigated the diminution of a depot of vitamin D_3 3 C^{14} formed by intramuscular injection.

We injected chickens in the musculus pectoralis with 0,25 ml arachis oil which contained 20.000 I.U. vitamin D_3 3 C^{*4}. On various times after the injection a chicken was sacrificed. We dissected the musculus pectoralis, isolated the unsaponifiable and determined the radio active material still present. At the same time a colorimetric determination of vitamin D_3 in the unsaponifiable material was carried out beside the measurement of the radio activity. Here we made use of the colour reaction of vitamin D_3 with $SbCl_3$. Disturbing impurities were removed by chromatography first.

From our experiments it can be concluded that a depot formed by intramuscular injection of a vitamin D_3 solution in oil, disappears only slowly out of the chicken's pectoral muscle. The presence of vitamin D_3 can still be traced after the injection for about 7 months at least.

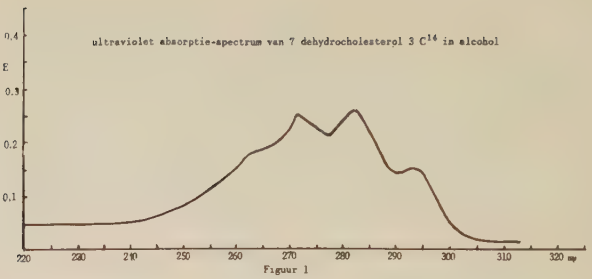
LITERATUUR

1 R. B. Turner, J. Am. Chem. Soc. *69*, 726 (1947)
2 R.B. Turner, Science *106*, 248 (1947)
3 H. Reich en A. Lardon, Helv. Chim. Acata *29*, 671 (1946)
4 W.G. Dauben en J.F. Eastham, J. Am. Chem. Soc. *72*, 2305 (1950)
5 W.G. Dauben en J.F. Eastham, J. Am. Chem. Soc. *73*, 4463 (1951)
6 E. Schwenk, M. Gut en J. Belisle, Arch. Biochem. *31*, 456 (1951)
7 T.F. Gallagher en B. Belleau, J. Am. Chem. Soc. *73*, 4458 (1951)
8 A.J. Birch, J. Chem. Soc. 2325 (1950)
9 R.B. Turner, J. Am. Chem. Soc. *72*, 579 (1950)
10 A. Windaus, Ber. *39*, 2010 (1906)
11 C. Doree en J.A. Gardner, J. Chem. Soc. *93*, 1330 (1908)
12 C.C. Bolt, Rec, trav. chim. *57*, 905 (1938)
13 G.I. Fujimoto, J. Am. Chem. Soc. *73*, 1856 (1951)
14 R.D.H. Heard en P. Ziegler, J. Am. Chem. Soc. *73*, 4036 (1951)
15 M. Calvin, C. Heidelberger, J.C. Reid, B.M. Tolbert, P.F. Yankwhich, *Isotopic Carbon*blz. 175
16 J.T. van Bruggen, C.K. Claycomb en T.T. Hutchens, Nucleonics *7* 45 (1950)
17 H.H. Inhoffen, Ber. *69*, 2141 (1936)
18 A. Westphal, Ber. *70*, 2128 (1937)
19 H.H. Inhoffen en G. Stoeck, Ann. *563*, 131 (1949)
20 E. Dane, Y. Wang em W. Schulte, Z. physiol. Chem. *245*, 80 (1937)
21 C.W. Shoppee, J. Chem. Soc. 1043 (1948)
22 H. McKennis en G.W. Gaffney, J. Biol. Chem. *175*, 217 (1948)
23 C.W. Shoppee en G.H.R. Summers, J. Chem. Soc. *687*, (1950)
24 H.H. Inhoffen, G. Stoeck, G. Kolling en U. Stoeck, Ann. *568*, 52 (1950)
25 G.A.D. Haslewood, Bioch. J. *41*, 639 (1947)
26 R. Schoenheimer en E.A. Evans Jr, J. Biol. Chem. *114*, 567 (1936)
27 H.E. Stavely en W. Bergmann, J. Org. Chem. *1*, 567 (1937)
28 R.F. Nijstrom en W.G. Brown, J. Am. Chem. Soc. *69*, 1197 (1947)
29 Organic Reactions VI, blz. 471
30 F.A.H. Hochstein en W.G. Brown, J. Am. Chem. Soc. *70*, 3484 (1948)
31 C.A. Coulson, *Valence* blz. 226 (1952)

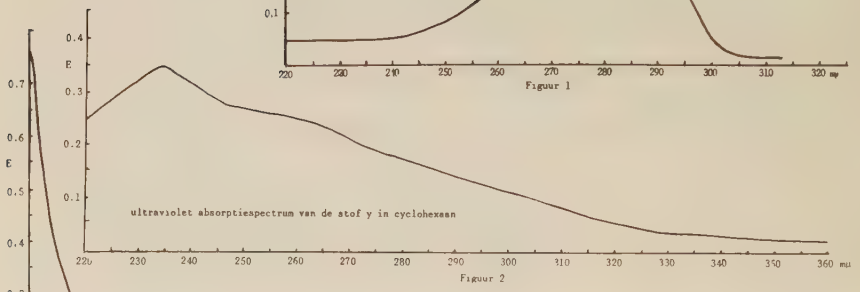
32 H. Eyring, J. Walter, G.E. Kimball, *Quantum Chemistry* blz. 99 en 254 (1944)
33 C.A. Coulson en J. de Heer, Trans. Faraday Soc. *47*, 681 (1951)
34 C.A. Coulson, *Valence* hoofdstuk 9, par. 8 (1952)
35 A. Windaus, H. Lettre en F. Schenck, Ann. *520*, 98 (1935)
36 Dissertatie J. van der Vliet, Groningen 1946
37 J.A. Keverling Buisman, W. Stevens en J. v.d. Vliet, Rec. trav. chim. *66*, 83 (1947)
38 K. Ziegler, A. Spath, E. Schaaf, W. Schumann en E. Winkelmann, Ann. *551*, 80 (1942)
39 A.E. Bide, H.B. Henbest, E.R.H. Jones, R.W. Peevers en P.A. Wilkinson, J. Chem. Soc. *17*, 83 (1948)
40 H. Schaltegger en T.X. Mullner, Helv. Chim. Acta, *34*, 1096 (1951)
41 Zie 39
J. Redel en B. Gauthier, Bull. Soc. Chim. France *15*, 607 (1948)
S. Bernstein, L.I. Binovi, L. Dorfman, K.J. Sax en Y. Subbarow J. Org. Chem. *14*, 133 (1949)
E.R.H. Jones en R.W. Peevers Brit. Patent 574.432. Chem. Abstr. *42* 7797 (1948)
A. Lowenstein Brit. Patent 604.328. Chem. Abstr. *43*, 700 (1949)
42 L. Velluz, G. Amiard en A. Petit, Bull. soc. chim. France, 501 (1949)
43 D. Crowfoot en J.D. Dunitz, Nature *162*, 608 (1948)
44 E.H. Reerink en A. van Wijk, Biochem. J. *23*, 1294 (1929) Proc. Acad. Sci. Amsterdam, *32*, 845 (1929)
45 R.K. Callow, Chemistry at the Centenary Meeting of the British Association 1931. blz. 149
46 A. Windaus, A. Luttringhaus en M. Deppe, Ann. 489, 252 (1931)
47 A. Windaus en E. Anhagen, Z. physiol. Chem. *196*, 108 (1931)
48 Dissertatie J. van der Vliet, Groningen, 1946, blz. 90
49 R.W. Haman en H. Steenbock, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. *8*, 291 (1936)
50 R.S. Harris, J.W.M. Bunker en L.M. Mosher, J. Am. Chem. Soc. *60*, 2579 (1938)
51 Dissertatie J. van der Vliet, Groningen, 1946 blz. 8
52 A. Windaus, F. Schenk en F. v. Werder Z. physiol. Chem. *241*, 100 (1936)
A. Windaus, M. Deppe en W. Wunderlich Ann. *533*, 118 (1937)
53 H. Vogel en H. Knobloch, Chemie und Techniek der Vitamine, blz. 222 (1950)
Octrooivoorschriften van de I.G. Farbenindustrie

N.O.S. 51831 = N.O.A. 94258
F.P. 860509; Joegosl. P. 16210/211
54 Zie 44
E.H. Reerink en A. van Wijk, Strahlentherapie *40*, 728 (1931)
A. van Wijk, E.H. Reerink en W. Morikofer Strahlentherapie *39*, 80 (1930)
55 A. Windaus, K. Dithmar en E. Fernholz, Ann. *493*, 265 (1932)
56 B.L. Oser, D. Melnick en M. Pader, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. *15*, 717 (1943)
57 H. Gilman en Ch.H. Meyers, J. Am. Chem. Soc. *45*, 159 (1923)
58 H. Gilman, P.D. Wilkinson, W.P. Fishel en C.H. Meyers, J. Am. Chem. Soc. *45*, 150 (1923)
59 C.K. Claycomb, T.T. Hutchens en J.T. van Bruggen, Chem. Eng. News 28, 1324 (1950)
60 J.H.A. Hoeflake, Rec. trav. chim. *35*, 30 (1916)
61 Organic Syntheses 21, blz. 8 en 18
62 D.H.R. Barton en E.R.H. Jones, J. Chem Soc. 602 (1943)
63 V.L. Hansley en P.J. Carlisle, Chem. Eng. News *23*, 1332 (1945)
64 T. Reichstein en C.W. Shoppee, Discussions of the Faraday Society *7*, 305 (1949)
65 Ch. Mauguin, Ann. Chim. (8), *22*, 302 (1911)
66 S. Winstein en R.B. Henderson, J. Am. Chem. Soc. *65*, 2196 (1943)
67 Zie 38 en J. Lecocq, Ann. Chim. (12) *3*, 626 (1948)
68 T.B. Johnson en I.B. Douglas, J. Am. Chem. Soc. *61*, 2548 (1939)
69 Organic Syntheses. 17, blz. 47
70 F. Reinitzer, Monatsh. 428 (1888)
71 Zie 3 en PL.A. Plattner en W. Lang, Helv. Chim. Acta *27*, 1872 (1944)
72 Th.H. Vaughn, R.R. Vogt en J.A. Nieuwland, J. Am. Chem. Soc. *56*, 2120 (1934)
73 R.S. Yost en Ch.R. Hauser, J. Am. Chem. Soc. *69*, 2325 (1947)
74 J. Halberstadt, Chem. Weekblad *47*, 701 (1951)
75 A.H.W. Aten Junior, Chem. Weekblad *47*, 553 (1951)
76 M. Calvin, C. Heidelberger, J.C. Reid, B.M. Tolbert, P.F. Yankwich, *Isotopie Carbon* blz. 66
77 D.D. van Slijke, I.H. Page en E. Kirk, J. Biol. Chem. *102*, 635 (1933)
78 D.D. van Slijke en J. Folch, J. Biol. Chem. *136*, 509 (1940)
79 A. Lindenbaum, J. Schubert en W.D. Armstrong, Anal. Chem. 20, 1120 (1948)
80 W.D. Armstrong, L.Singer, S.H.Zbarsky en B. Dunshee, Science 112, 531 (1950)

81 J.A. Thorn en Ping Shu, Can. J. Chem. *29*, 558 (1951)
82 L. Buchanan en A. Nakao, J. Am. Chem. Soc. *74*, 2389 (1952)
83 F. Gstirner, Chemisch-physikalische Vitamin-bestimmungsmethoden (1951)
84 W. Halden en H. Tzoni, Biochem. Z. *287*, 18 (1936)
85 M. Tortelli en E. Jaffé, Biochemica *5*, 528 (1940)
86 H. Brockmann en H. Chen. Z. physiol. Chem. *241*, 129 (1936)
87 H. Schaltegger, Helv. Chim. Acta *29*, 285 (1946)
88 A. Sobel, A. Mayer en B. Kramer, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. *17*, 160 (1945)
89 C.H. Nield, W.C. Russel en A. Zimmerli, J. Biol. Chem. *136*, 73 (1940)
90 P.B. Muller, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. *40*, 376 (1949)
91 A. Windaus en A. Luttringhaus, Ber. 64 B, 850 (1931)
92 G. Pirlot en E.V. Rongir, Bull.Soc. Chim. Belges *56*, 296 (1947)
93 J. Green, Biochem. J. *49*, 54 (1951)
94 H. Vollmer, Deutsche med. Wschr. *53*, 1634 (1927); Zeitschr. f. Kinderh. *45*, 265 (1928); Monatsschr. f. Kinderh. *38*, 70 (1928)
95 D. Krestin, Brit. Med. J. 78 (1945)
96 W. Heymann, J. Biol. Chem. 118, 371 (1937)
97 Ph.A. Coppens en G.A. Metz. Arch. néerland. physiol. *18*, 407 (1933)
98 R. Houet, C.R. Soc. Biol. *141*, 1209 (1947)
99 H. Jesserer, Wiener Klin. Wschr. *62*, 129 (1950)
100 H. Gonnelle, H. Teulon, R. Paulais, C.R. Soc. Biol. *143*, 471 (1949)
101 J. v. Niekerk en M.S.C. Bliek, Ned.Tijdschr. v. Geneesk. *85*, 522 (1941)
102 J. v. Niekerk en M.S.C. Bliek, Ned. Tijdschr. v. Geneesk. *85*, 860 (1941)

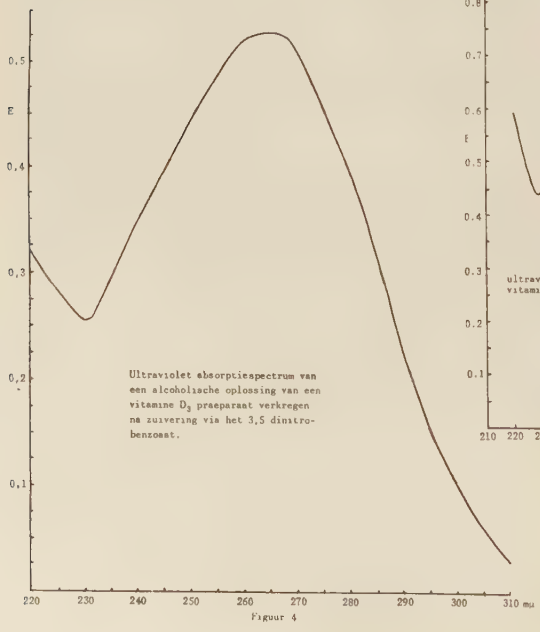


Figuur 1

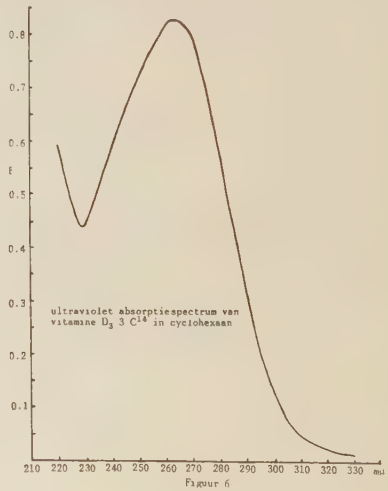


Figuur 2

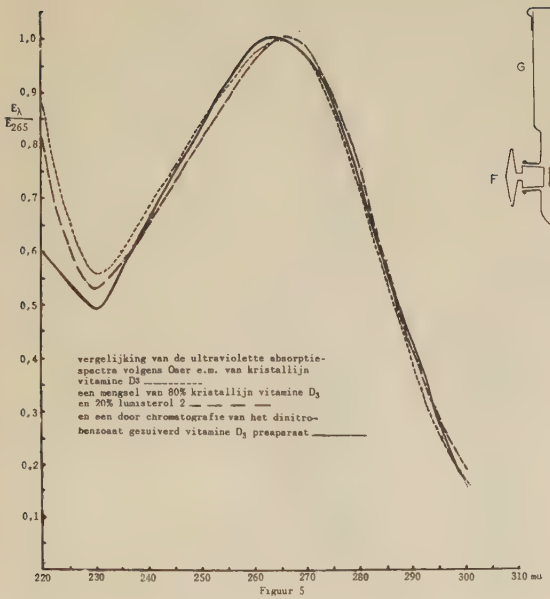
Figuur 3



Figuur 4



Figuur 6



Figuur 5

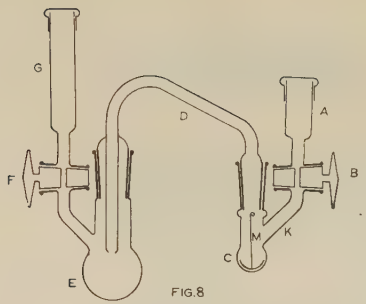


FIG.8

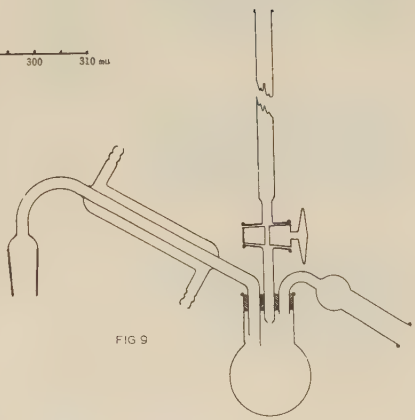
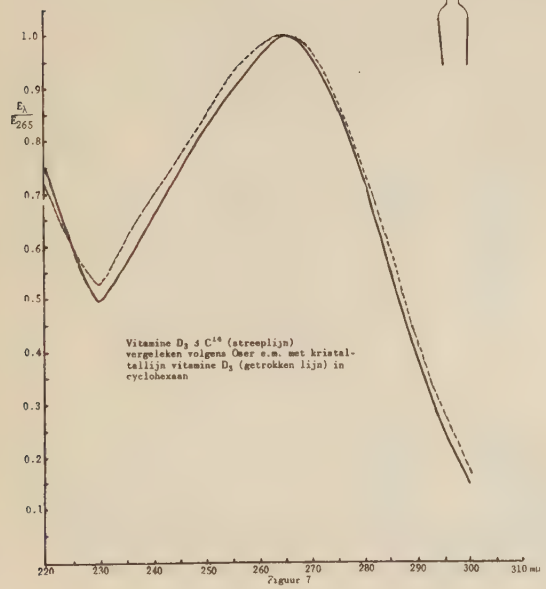


FIG 9



Figuur 7

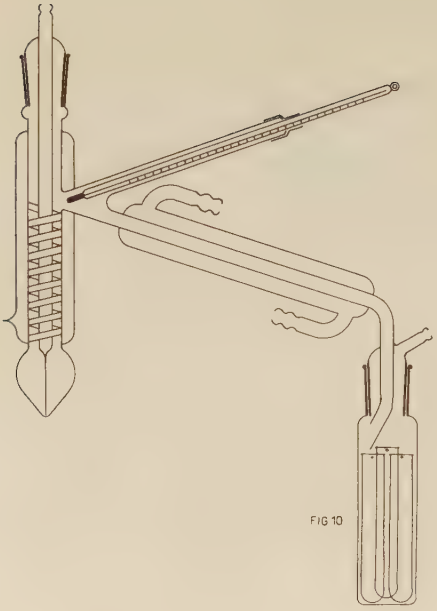


FIG 10

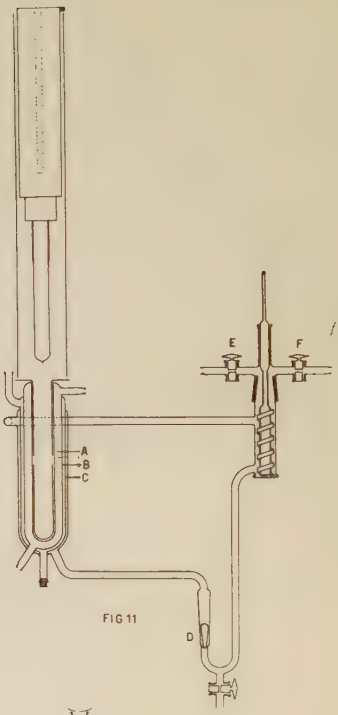


FIG 11

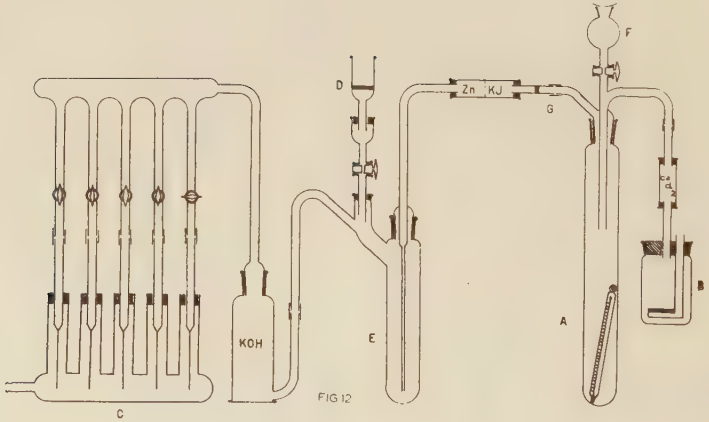


FIG 12

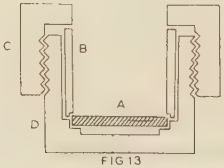
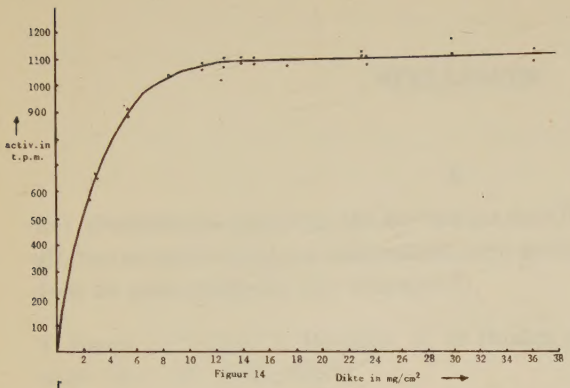
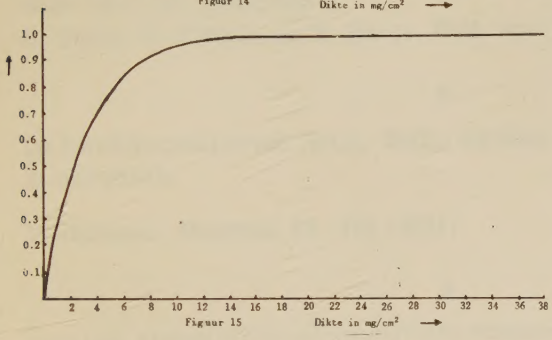


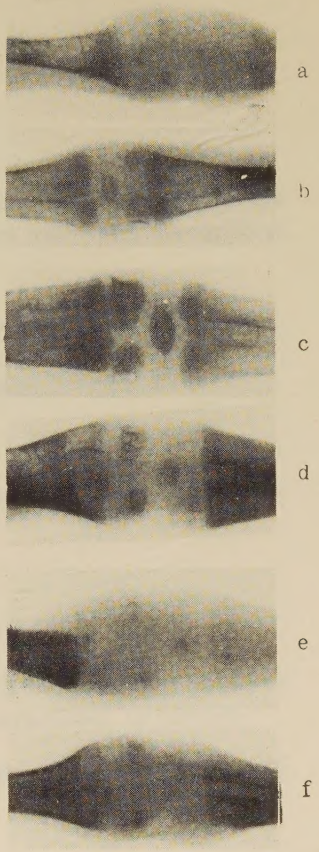
FIG 13

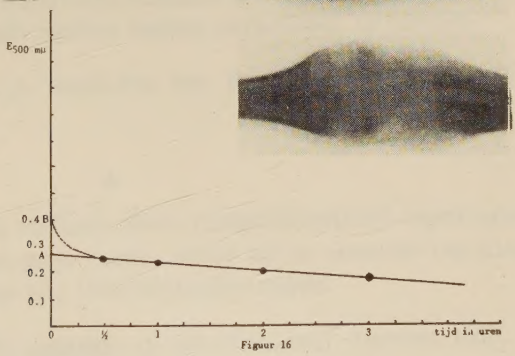


Figuur 14

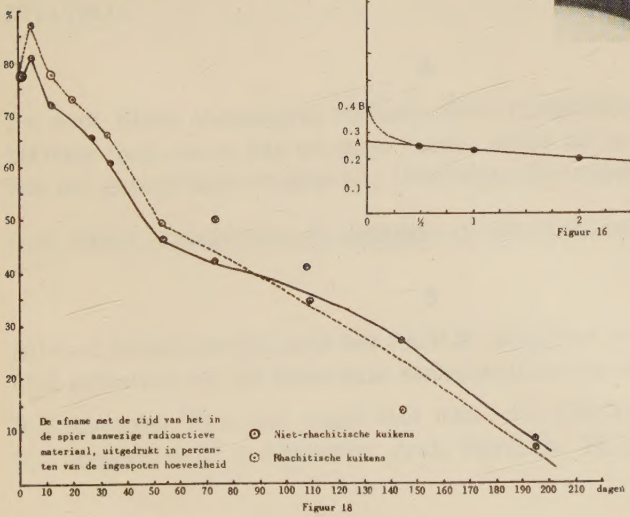


Figuur 15





Figuur 16



Figuur 18